N° d'enregistrement au C.N.R.S.

THESE
de
DOCTORAT D'ETAT
ès Sciences Naturelles

présentée

A L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
-PARIS 6-

par

M. GAILLARDIN Claude

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ès SCIENCES

Sujet de la thèse :

GENETIQUE DE LA LEVURE SACCHAROMYCOPSIS LIPOLYTICA CONTRIBUTION A L' ETUDE DU METABOLISME DE LA LYSINE

soutenue le

Avril 1976

devant le jury composé de :

Monsieur SLONIMSKI
- HESLOT
- LACROUTE
- PATTE
- GANS

N° d'enregistrement au C.N.R.S.

THESE
de
DOCTORAT D'ETAT
ès Sciences Naturelles

présentée

A L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
-PARIS 6-

par

M. GAILLARDIN Claude

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ès SCIENCES

Sujet de la thèse :

GENETIQUE DE LA LEVURE SACCHAROMYCOPSIS LIPOLYTICA CONTRIBUTION A L'ETUDE DU METABOLISME DE LA LYSINE

soutenue le

Avril 1976

devant le jury composé de :

Monsieur SLONIMSKI
- HESLOT
- LACROUTE
- PATTE
- GANS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A (pesar de) Don Crispal , Miguel et quelques autres....

Vamos a meternos dentro de un café

Y a pensar en lo que pudimos ser y no fuimos

D. LEYVA *Crispal*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

1ère Partie - MATERIEL ET METHODES

I. LE MATERIEL 3

A. Rappel des travaux effectués sur *Candida lipolytica* 3

B. Aspects morphologiques 4

C. Cycle de *Saccharomycopsis lipolytica* 5

a) Phase haploïde
b) Phase diploïde
c) Formation des ascospores

D. Souches sauvages utilisées 7

II. TECHNIQUES DE CULTURE

A. Milieux utilisés 8

a) Milieux de croissance
b) Milieux de croisement
c) Remarques sur les milieux minéraux

B. Conditions de culture et de conservation 12

C. Mesure de la croissance 13

D. Etude des phénotypes sur boîte 14

a) Test en points
b) Répliques
c) Excrétion
d) Détermination d'un besoin inconnu

III. TECHNIQUES GENETIQUES

A. Mutagénèse et enrichissement en mutants 17

a) Mutagénèse UV
b) Mutagénèse NMU
c) Enrichissement à la nystatine

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548119_0001

B. Isolement de diploïdes 18

a) Copies croisées
b) Isolement en masse

C. Analyse des diploïdes 20

a) Analyse de spores en masse
b) Conversions mitotiques induites aux γ

D. Nomenclature et souches utilisées 22

IV. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

A. Récolte des cellules et préparation des extraits 28

B. Dosage enzymatiques 29

a) Dosage de l'HS 31
b) Dosages de l'AAR 32
c) Dosage de l'AASAGR 35
d) Dosage de la SDH 36
e) Dosage de l'AAR, AASAGR et SDH sur un même extrait 39
f) Remarques sur les dosages des activités AAR, AASAGR et SDH 40

V. TECHNIQUES ANALYTIQUES

A. Dosage de la lysine 41

a) Extraction des "pools"
b) Détermination de la lysine
c) Expression des concentrations de lysine

B. Systèmes chromatographiques 43

VI. MESURE DE L'ENTREE DE L'α AMINOADIPATE 44

2ème Partie - CONSTITUTION D'UN OUTIL GENETIQUE

I. ETUDE DES CONDITIONS D'OBTENTION DE MUTANTS

A. Choix d'un mutagène 46

B. Choix d'une méthode d'enrichissement 49

II. CONDITIONS DE CROISEMENT

A. Etude de la conjugaison 51

a) Choix d'une méthode 52
b) Vérification de la nature diploïde des souches obtenues 55
c) Etude des conditions de milieu 56
d) Autres paramètres affectant la conjugaison 60

B. Etude de la sporulation 62

a) Conditions de milieu
b) Conditions d'ensemencement et de culture
c) Remarques sur la technique de croisement retenue.

III. AMELIORATION DES SOUCHES PAR CROISEMENT

A. Croisement frère x soeur 66

B. Essai d'isogénisation des souches 70

a) Constitution de souches de référence
b) Isogénisation d'autres souches

C. Valeur des souches isogénisées 72

a) Liaison des marqueurs
b) Analyse de tétrades

D. Etude de la ségragation de mutations induites 78

a) Etude de lys12 80
b) Etude de lys14 81
c) Etude de ril14 82

3ème Partie - ETUDE DE MUTANTS AFFECTES DANS LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA LYSINE

I. ETUDE DE MUTANTS AUXOTROPHES

A. Croissance sur intermédiaires et accumulation 88

a) Croissance sur lysine
b) Croissance sur intermédiaires
- Transport de l'αAA
c) Produits d'accumulation

B. Caractérisation génétique et biochimique des mutants 92

a) Test de complémentation
b) Liaison des marqueurs lys
c) Etude enzymologique des mutants

C. Etude génétique des mutants du locus (lys1.) 98

a) Suppression phénotypique et réversibilité
b) Complémentation fonctionnelle
c) Liaison

D. Etude des mutations affectant le système AAR loci (lys2.) et (lys3.) 113

a) Etude génétique des mutants AAR⁻
b) Etude des conditions de complémentation in vitro
c) Etude des conditions de complémentation in vivo

E. Recherche d'un branchement de la voie 121

II. APPROCHE PHYSIOLOGIQUE DES ELEMENTS DE REGULATION DE LA VOIE

A. Etude des effecteurs de l'homocitrate synthétase 125

a) Résumé des observations antérieures
b) Recherche d'inhibitions concertées
c) Etude des conditions de désensibilisation

../..

B. Recherche de variations d'activité spécifiques de l'HS 139

a) Etudes des conditions de répression - dérépression
b) Etude de l'effet de mutations d'auxotrophie
c) Effet de la lysine sur les mutants "dérépримés"
d) Variations de l'activité en cours de croissance
e) Dosages géniques

C. Etude des variations d'activité spécifique de la Saccharopine déshydrogénase 152

a) Effets de divers composés sur les divers enzymes de la voie
b) Effet de la lysine sur la SDH
c) Dosages génétiques en cours de croissance
d) Variations en cours de croissance.

III. APPROCHE GENETIQUE DES ELEMENTS DE REGULATION

A. Recherche de mutants de feedback dans les réversions de (lys1.) 178

B. Effets d'analogues toxiques de la lysine 181

C. Etude de la résistance à la TDL 184

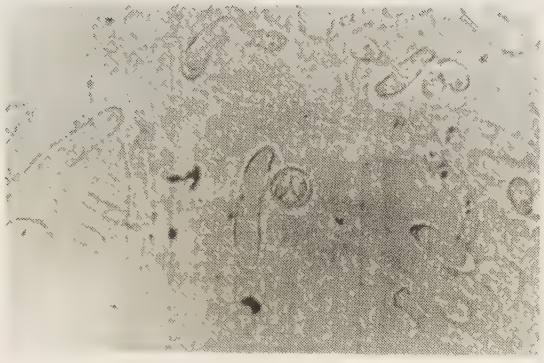
a) Isolement de mutants à partir de W29
b) Etude de mg-5
c) Recherche d'autres mutants TDL^R

D. Etude de la résistance à l'AEC 192

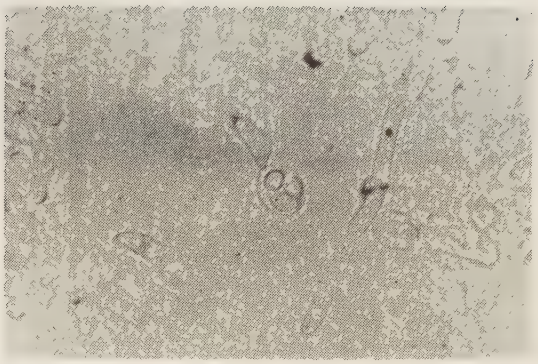
a) Isolements de mutants à partir de mg-5 192
b) Etude génétique des mutations AEC^R 193
c) Etude enzymatique des souches AEC^R 197

Conclusion 3ème partie 200

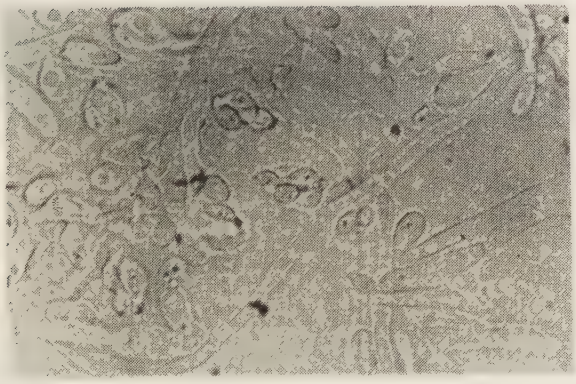
CONCLUSION 204



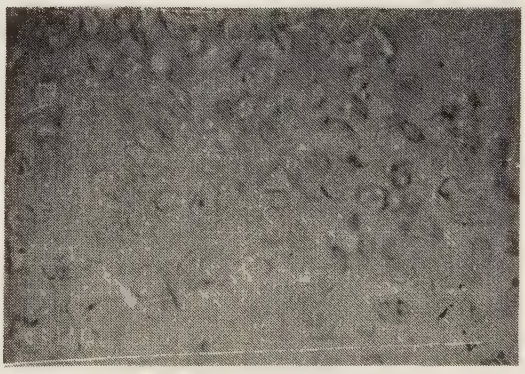
- ASQUE à 2



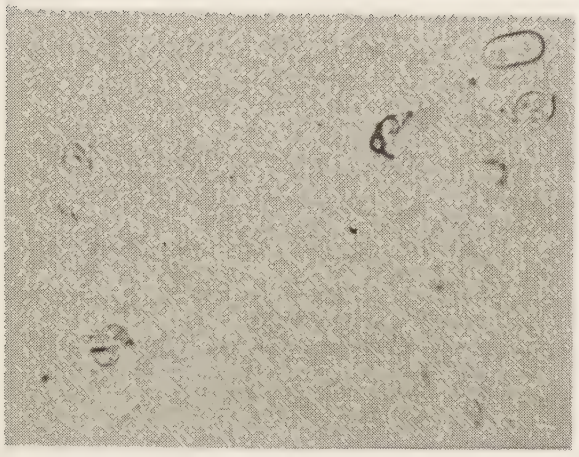
- ASQUE à 3



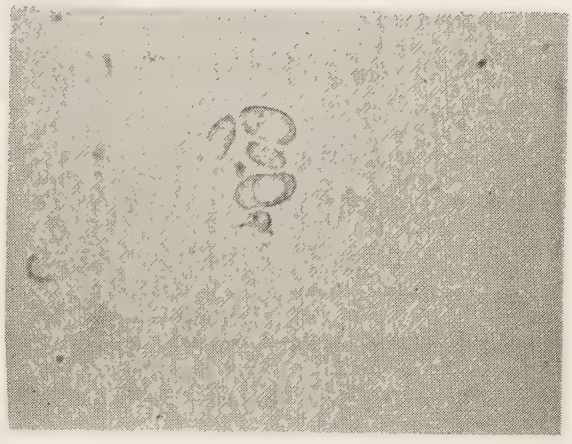
- ASQUE à 4



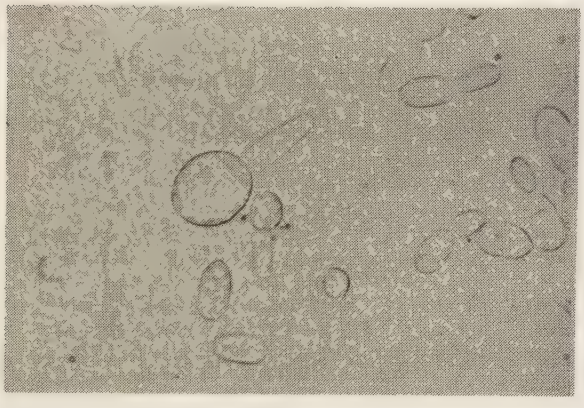
- SPORES LIBRES après traitement à l'enzyme d'escargot



- 1



- 2



- 3

- 4

- 1 à 3 STADES SUCCESSIFS (?) de la GERMINATION D'UNE ASCOSPORE

- 4 ZYGOTE.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Génétique de l'Institut National Agronomique sous la direction de Monsieur HESLOT.

Monsieur HESLOT m'a accueilli dans son laboratoire et m'a toujours apporté son soutien en me laissant la plus grande liberté dans la conduite de ce travail : qu'il en soit remercié ainsi que des conseils qu'il m'a donnés tout au long de mon séjour.

Messieurs SLONIMSKI, PATTE, LACROUTE et Madame GANS m'ont fait l'honneur de juger ce travail : je leur en suis très reconnaissant et plus encore du temps qu'ils m'ont accordé pour discuter certains résultats.

Ce travail n'aurait sans doute jamais vu le jour sans l'intérêt qu'a manifesté la Société ELF FRANCE pour le développement des recherches sur la génétique des levures susceptibles d'utiliser les normales paraffines : je tiens à la remercier en les personnes de Messieurs VERNET et de BAYNAST qui m'ont procuré les facilités matérielles nécessaires. L'INRA et la DGRST ont soutenu ce projet, et le Département de Biologie du CEA a obligeamment fourni les molécules marquées : qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Il me serait sans doute difficile de passer sous silence tout ce que je dois à ceux qui ont travaillé avec moi : V. CHAROY s'était spécialisée dans les techniques d'analyse automatique et a bien voulu m'assister dans la mise au point des techniques génétiques; L. POIRIER m'a appris le peu de biochimie pratique que je sais et a surtout réalisé la plupart des expériences dans ce domaine, G. SYLVESTRE a accepté de tester un grand nombre de mutants et a su mener à bien les premières

dissections d'asques : une grande partie des résultats expérimentaux leur est due, qu'elles en soient toutes remerciées.

P. MALDONADO a mis au point le dosage de l'homocitrate synthétase et a su me faire profiter de ses profondes connaissances en Chimie Organique; M. NAGY n'a pas hésité à me rappeler cent fois les bases de la cinétique enzymatique et a supporté avec patience l'énoncé de mes résultats "bizarres"; M. ROCHET a tenté de faire entrer un peu de rigueur dans mes démarches et de hauteur de vue dans mes conclusions : sans eux, cette thèse eut été bien pire.

Bien d'autres sans doute devraient être cités que je n'oublie pas et qui m'ont apporté leur aide et leur amitié: puisse ce qui va suivre ne pas donner une trop piètre idée de leurs qualités.

INTRODUCTION

L'emploi des acides aminés de synthèse dans l'alimentation du bétail s'est progressivement accru depuis 1955 environ, au fur et à mesure que se précisaient la connaissance des besoins nutritionnels et la notion de facteur limitant relatif. C'est ainsi que pour les monogastriques et la volaille, la méthionine apparaît comme le facteur limitant de la plupart des tourteaux (soja, arachide) et que la lysine limite l'apport protéique des céréales (blé, maïs, orge ...). Ce phénomène place certains pays,dont la production agricole est, pour une raison ou pour une autre, mal adaptée ou spécialisée, dans une situation de dépendance protéique. C'est ainsi que la France dépense environ 2 milliards de francs par an pour s'approvisionner en tourteaux. Plusieurs remèdes à cette situation ont été proposés : développement des cultures protéagineuses, amélioration génétique du contenu protéique des céréales, culture de spirulines sur eau de mer ou de levures et de bactéries sur dérivés du pétrole ... Toutes ces solutions visent davantage à assurer un "apport protéique global" plutôt qu'à compenser spécifiquement une ration existante par un ou plusieurs acides aminés essentiels.

Or on peut aujourd'hui produire par synthèse, fermentation ou extraction, la plupart des acides aminés essentiels. On a pu calculer que vers les années 1980, la lysine pourrait avoir un marché national voisin de 15 000 tonnes par an (100 000 tonnes par an pour la CEE élargie), ce qui permettrait l'économie de 320 000 tonnes de tourteaux de soja. C'est cette seconde approche qui a justifié le lancement d'un grand nombre d'études sur la production spécifique de cet acide aminé. L'impératif premier auquel devront satisfaire toutes les solutions pour la production industrielle de lysine à usage alimentaire est le prix.

../..

Dans le cas de la lysine biologique, on est donc conduit à rechercher des substrats de croissance abondants et bon marché, tels que les mélasses, les hydrocarbures, le méthanol ... qui définissent dans une certaine mesure le microorganisme utilisable. Dans le cadre d'un contrat passé avec l'entreprise ELF FRANCE, nous avons été amenés à étudier plus précisément les possibilités d'exploitation d'une levure utilisant les paraffines linéaires, *Candida lipolytica*.

L'emploi plus ou moins rationnel des microorganismes pour l'excrétion de métabolites a débuté avec la publication des travaux d'Umbarger (1956) et de Yates et Pardee (1956) qui décrivaient les phénomènes de rétroinhibition. Il est alors devenu évident que seule la connaissance des mécanismes de régulation des voies métaboliques permettrait l'élaboration d'un programme de recherche cohérent. Mais si la biosynthèse de la lysine et sa régulation sont relativement bien connues chez les bactéries, il n'en va pas de même chez les levures qui ont d'ailleurs développé une voie originale, différente de celle des bactéries ou des plantes vertes.

Nous avons donc été amenés à conduire dans un premier temps une recherche plus "fondamentale" des différents paramètres qui contrôlent la production de la lysine chez la levure. Il nous fallait pour cela disposer d'un outil génétique de base qui nous permettrait à la fois d'étudier individuellement l'effet d'une mutation induite dans une souche et de recombiner éventuellement différentes mutations. Le plan de travail qui va suivre était donc apparemment tout tracé.

Première partie

MATERIEL ET METHODES

I. LE MATERIEL

A. Rappel des travaux effectués sur *Candida lipolytica* (Harrisson) Diddens et Lodder 1942

Cet organisme a longtemps été considéré comme un champignon imparfait et rangé pour cette raison dans le genre très hétérogène des *Candidae*, qui regroupe toutes les levures asexuées dimorphiques qu'aucun caractère particulier ne permet de rattacher à un groupe mieux défini. Ses particularités écologiques et physiologiques en font une levure facilement identifiable (Wickerham et al. 1969): on l'isole plus fréquemment à partir de substrats protéiques ou lipidiques que glucidiques, elle assimile d'ailleurs très peu de sucres (essentiellement le glucose) mais utilise les polyalcools et les acides organiques (glycérol, erythreitol, mannitol, éthanol, acétate, lactate, succinate et citrate) ainsi que certains substrats moins classiques telles les paraffines linéaires. Elle est strictement aérobie. Par ailleurs l'espèce est réputée pour la productio de lipases et surtout de protéases ("this species is probably unsurpassed among yeasts for extracellular protease activity" Wickerham et al. 1969).

Ces dernières caractéristiques lui ont valu très tôt l'intérêt des microbiologistes industriels (Peters et Nelson 1948), mais actuellement c'est son aptitude à utiliser les paraffines qui lui vaut un surcroît d'intérêt dans le cadre de la production de métabolites ou de protéines d'origine unicellulaire. De nombreux travaux ont donc été consacrés à la détermination de ces paramètres de croissance (voir par exemple Ballerini 1970) et aux conditions de

../..

production d'acides organiques (Tabuchi et al.1969, Tsugawa et al. 1969) à partir d'alcanes normaux.

L'étude microbiologique de cette levure fut reprise par Wickerham et al. (1970) sur 5 souches de la collection de Peoria, isolées en 1945. L'une de celles-ci s'avéra être une forme sporulante stable produisant des asques contenant 0 à 4 spores. Parmi les 4 autres souches, ou trouvait les représentants des deux formes haploïdes compatibles. L'espèce d'abord redéfinie comme une *Endomycopsis*, semble aujourd'hui devoir s'appeler définitivement *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow 1972), ordre des *Endomycetales*, famille des *Saccharomycetacae*.

B. Aspects morphologiques

S. lipolytica présente une grande variété de formes cellulaire et coloniales. Sur milieu minéral, les cellules sont généralement levuriformes, tandis qu'elles sont plus allongées sur milieu à l'extrait de levure, mais on trouve, avec des fréquences plus ou moins stables, toutes les formes dans toutes les conditions. En milieu liquide, la phase stationnaire est caractérisée par de petites cellules rondes sans bourgeon (blocage en G1). Sur milieu solide, la phase exponentielle levuriforme est très courte et on assiste rapidement à la formation de pseudomycélium d'abord, puis de mycélium vrai caractérisé par l'existence d'articles terminaux atteignant une longueur double des articles antérieurs. Ce mycélium donne aux colonies une texture et une forme particulières et variables, ce qui permet la distinction de plusieurs types coloniaux.

La possibilité de filamenter est liée à deux processus distincts au moins qui sont l'un et l'autre fortement affectés par l'oxygène : la sporulation et l'aptitude à

croître sur hydrocarbones. Les mutants qui ne filamentent plus sur milieu solide poussent mal sur paraffines et le diploïde résultant de la fusion de deux mutants de ce type est souvent asporogène ou de fertilité réduite (voir plus bas).. On peut signaler à ce sujet que le passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire s'accompagne d'une modification du type de respiration utilisé (Hwang et al. 1974). *S. lipolytica* pourrait donc éventuellement constituer un nouveau matériel pour l'étude de la différenciation cellulaire.

Les colonies d'une souche isolée de la nature présentent par ailleurs une grande variété de formes, de textures, de types de croissance et de couleurs. Cette hétérogénéité coloniale persiste après plusieurs sous-clonages : elle est peut-être l'indice d'une aneuploïdie élevée ou d'une instabilité génique du type de celle qui est invoquée pour les "population patterns" de *Penicillium chrysogenum* (Backus et Stauffer, 1955). Après un grand nombre de repiquages sans sous-clonage, on obtient sur un milieu défini un type colonial majoritaire ou unique dans lequel on peut réinduire des variants morphologiques. Mortimer (1974) a pu préciser le déterminisme mendélien d'un certain nombre de ces caractères.

C. Le cycle de *Saccharomycopsis lipolytica*.

C'est un ascomycète hétérothallique, les deux signes étant dénommés A et B. Le cycle comprend classiquement deux phases seulement, haploïde et diploïde, la phase dicaryotique étant réduite à la formation du zygote.

a) Phase haploïde

La germination d'une ascospore qu'on peut suivre approximativement sur les photos (1 à 3) donne immédiatement

naissance à un stade levuriforme de dimensions moyennes 3 x 4 µ, par bourgeonnement de l'exosporium. Ce stade se poursuit plus ou moins longtemps selon les conditions, puis une différenciation apparaît, conduisant à la formation de cellules allongées (5 à 10 µ) qui peuvent former un pseudomycélium ou des hyphes cloisonnés atteignant plusieurs millimètres de longueur sur milieu solide. Les articles sont de taille variable (entre 10 et 50 µ de long sur 2 à 3 µ de large), l'article terminal dépassant parfois 100 µ. Les articles bourgeonnent fréquemment des levures à une extrémité. On n'a jamais pu voir d'anastomose.

b) Stade diploïde

Si on cultive ensemble deux souches A et B, on assiste après 10 à 12 H. sur un milieu convenable (Herman 1971) à la formation de zygotes entre cellules isolées (photo 4). Dans le cas de souches sauvages isolées de la nature, un grand nombre de ces zygotes (entre 1% et plus de 50% selon les souches) présente rapidement un phénotype anormal : l'une des deux cellules engagées dans la conjugaison se vacuolise et se colore intensément au bleu de méthylène; l'origine de cette incompatibilité cytoplasmique n'a pas été étudiée. Selon les conditions de milieu, les zygotes viables peuvent alors soit former un asque par bourgeonnement d'une des cellules mères, soit donner naissance à une phase diploïde stable.

Celle-ci peut se maintenir indéfiniment et présente les mêmes caractéristiques dimorphiques que la phase haploïde. La taille moyenne des cellules levuriformes est alors de 4 x 10 µ tandis que les hyphes ont un diamètre de 4 à 5 µ. Chez *S. lipolytica*, la phase diploïde ne présente généralement pas d'avantage sélectif sur la phase haploïde (temps de génération identique).

../..

c) Formation des ascospores

Dans des conditions adéquates, la souche diploïde sporule et forme typiquement un grand nombre d'asques ovoïdes, généralement attachés à un hyphe et contenant 4 ascospores (photos 5 à 7). Les spores ont une forme caractéristique (demi coque de noix) et ne sont pas ordonnées dans l'asque. Avec une faible fréquence, on trouve des asques linéaires, mais il est encore impossible de dire si, dans ce cas, l'arrangement des fuseaux méiotiques a été conservé.

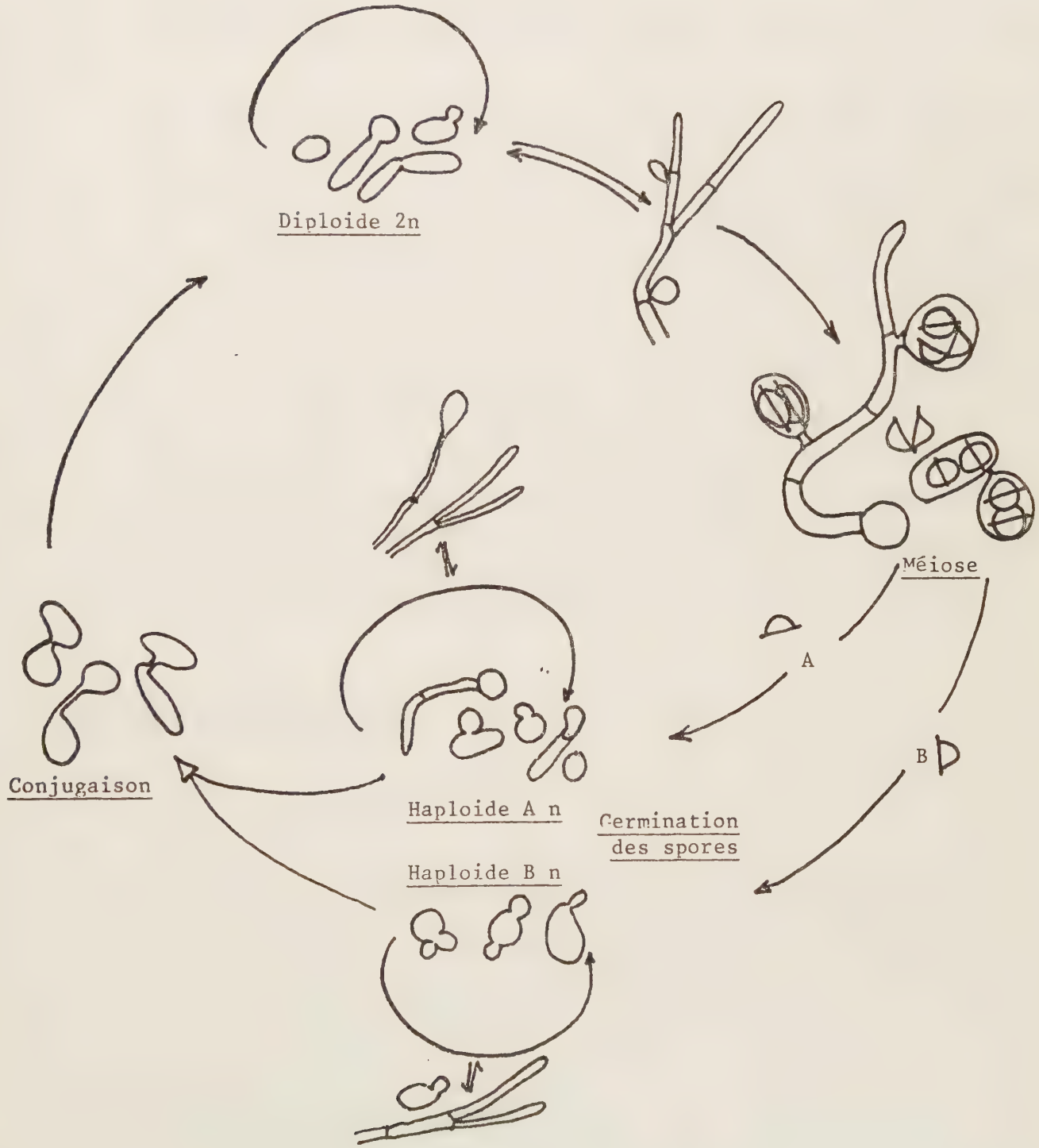
Les asques se séparent de l'hyphe à maturité puis libèrent les ascospores. Celles-ci restent fréquemment associées 2 par 2, mais il n'a pas été possible de préciser si ce phénomène avait une signification physiologique. Comme on le verra plus loin, il n'y a aucune indication de fusion de spores à la germination. Par ailleurs, les clones résultant de la germination d'une spore binucléée contenant les deux allèles de compatibilité ne sont jamais diploïdes (Esser, pers. Com.). On a là une situation très différente de celle de *S. cerevisiae* Winge 1958) où la diploïdisation suit immédiatement la germination des spores.

Le cycle est schématisé sur la figure 1.

D. Souches sauvages utilisées

Nous disposions initialement de la souche W29 de signe A, isolée par M. Gatelier de l'Institut Français du Pétrole, et des deux haploïdes compatibles 423-3 et 423-12 de Wickerham de signe A et B. Un certain nombre d'autres souches provenant de diverses collections (Institut Pasteur de Paris, Centraal Bureau vor Schimmelcultures de Delft, Dr. Tanaka Japon) ont été testées pour la compatibilité avec W29, 423-3 et 423-12. Sur 45 souches testées, 9 étaient diploïdes

Fig. 1 Schéma du cycle de *Saccharomycopsis lipolytica*.



n

On a représenté les aspects microscopiques correspondants.

27 de signe A, 16 de signe B et 2 ne se sont pas croisées (l'une de celle-ci était une *Candida paralipolytica*). La souche W29 étant a priori retenue, nous avions choisi la souche 423-12 comme second haploïde compatible de référence car elle se croisait relativement bien avec W29.

La souche W29 présentait une grande hétérogénéité coloniale qui s'est fortement atténuée par la suite : elle est actuellement homogène et forme sur milieu solide à l'extrait de levure des colonies régulières, dentelées et frisées. La souche 423-12 au contraire avait d'emblée une morphologie coloniale régulière, plus dense que celle de W29 et plus plate; elle avait été reconnue par Wickerham (1970) comme assez homogène génétiquement (forme des ascospores dans les croisements) et très réactive. Toutes les souches décrites dans ce travail sont dérivées de W29 et 423-12, rebaptisée Z30. Nos souches ne sont donc pas isogéniques des souches utilisées par l'équipe du Dr. Mortimer qui ont été dérivées de 423-12 et d'une autre souche de Wickerham, plus réactive que W29 (J. Bassel et al. 1971).

II. TECHNIQUES DE CULTURE

A. Milieux utilisés

Nous essaierons de justifier plus loin les raisons qui ont présidé à leur choix. Tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave 20 min. à 120°C, sauf le milieu V8 (15 min. à 110°C). Ils sont éventuellement solidifiés par de l'agar (Difco Bacto Agar) 2%.

a) Milieux de croissance

- Milieu complet YEA : Yeast extract Difco 0,5%, glucose 3% eau distillée. Ce milieu est tamponné par K_2HPO_4/ KH_2PO_4, pH 6,0 quand on l'utilise sous forme liquide.

Il sert essentiellement à la conservation des souches et à la croissance de certaines souches dont les besoins sont mal définis.

- Milieu minéral MM : Glucose 1%, solution A_2 10%, thiamine 10 ppm. La solution A_2, empruntée à Leupold (1955), comporte des sels minéraux et une source d'azote sous forme de sulfate d'ammonium. Ce milieu peut être tamponné à pH 5,0 par un tampon citrate 0,1 M, Na_2HPO_4 0,2 M. Pour compenser d'éventuels besoins nutritionnels, il est supplémenté en acides aminés ou en bases puriques (100 mg/l). Ces composés peuvent être remplacés par un hydrolysat d'acides nucléiques (MM Nuc) ou de caséine (MM Cas) (Casaminoacids Difco). Des vitamines sont éventuellement ajoutées (MM Vit) aux doses suivantes riboflavine, inositol, acide para-aminobenzoïque (tous à 200 ppm), acide nicotinique, pantothénate de calcium, pyridoxal (tous à 100 ppm), acide folique et biotine (10 ppm), choline (5 ppm).

On distingue par ailleurs quatre variantes :

- N5000 (ou MM s'il n'y a pas ambiguité): c'est le milieu ci-dessus qui contient 5000 mg/l de sulfate d'ammonium.
- N100 : le même, mais la concentration d'azote est réduite 50 fois (concentration finale 100 mg/l).
- N_0 : le même, sans ammonium dans les sels A_2. La source d'azote est éventuellement remplacée par un acide aminé ou une base purique (1 g/l) : on notera par exemple MM N_0 ProN ...
- MM sans glucose : celui-ci peut être remplacé par du glycérol, de l'éthanol ou de l'acétate 1%, des paraffines (hexadécane) 0,8%, ou de la lysine 15 g/l (MM lysC).

../...

b) Milieux de croisement

Ils sont tous utilisés sous forme solide :

- Milieu de présporulation ou PSM : 2% glucose, 0,5% $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% KH_2PO_4, 1% yeast extract Difco.

- Milieu de croisement YM : 0,3% Difco yeast extract, 0,3% extrait de malt (Bacto Malt Extract Difco), 0,5% bactopeptone Difco, 1% glucose.
  Les premiers diploïdes apparaissent après 1 jour, le maximum est atteint vers 4 jours.

- Milieu de sporulation V8C : On amène 1 l. de jus de légumes V8 (Campbell's Soup S.A., Felagara, Italie) à pH 6,8 par KOH 5N et on y ajoute 20 g de cellules W29 séchées (stock provenant d'une fermentation sur coupe paraffinique (C_{13} - C_{18}). On incube le mélange au bain marie bouillant pendant 20 min. en agitant, puis on filtre sur filtres Laurent (20, Rue des Envierges, Paris) et on double le volume du filtrat avec de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,8 par la potasse. Ce milieu assure la croissance de tous les auxotrophes testés jusqu'ici, de sorte qu'il permet un croisement entre souches compatibles marquées. Il doit néanmoins être supplémenté en lysine si l'on veut y faire sporuler un diploïde lys^-. Les diploïdes sporulent rapidement (1 à 2 jours) sur ce milieu; le mycélium prend alors une couleur foncée, sauf si le diploïde est homozygote pour le marqueur (col 1) : dans ce cas la couleur reste plus ou moins claire (la sporulation est par ailleurs réduite).

D'autres milieux de sporulation ont été occasionnellement utilisés et seront décrits plus loin.

../..

c) Remarques sur les milieux minéraux

- Source de carbone : la meilleure est le glucose. En N5000, la croissance est limitée par le glucose, en N100 par l'azote. Le glucose peut être remplacé par un alcool (glycérol, éthanol) ou un acide organique (citrate, lactate, succinate, ou acétate) mais dans ce dernier cas, les cultures se divisent de façon moins rapide après 5 à 6 générations. Sur acétate, la forme levure existe seule, les cellules sont plus grosses. La croissance sur hydrocarbures nécessite une adaptation (1 à 2 jours de latence).

- pH : la croissance est optimale entre pH 4,5 et 5,5 sur glucose, entre pH 5,0 et 6,0 sur glycérol et hydrocarbures; elle est possible sur tous ces milieux entre pH 2,0 et pH 7,0 (temps de génération inférieur ou égal à 6 H.

- Source d'azote : la meilleure est sans doute l'ammonium, le nitrate et le nitrite ne sont pas utilisés. Sur les milieux contenant peu d'azote (MMN_o) ou une source d'azote non utilisée (la lysine pour les mutants incapables de la dégrader), le mycélium prend une couleur marron et un aspect visqueux. Des observations analogues ont été faites sur le Coprin (Prévost 1962). On remarque également que les souches ont une couleur très blanche en début de croissance sur MM N5000 alors qu'elles sont crèmes sur YE ou N100.

- Besoin en vitamines : on a vérifié que seule la thiamine était nécessaire pour assurer une croissance optimale de *S. lipolytica*. Les besoins réels, de l'ordre de 10 ppm sur N5000, sont très largement satisfaits. On a en particulier vérifié que l'avidine n'empêchait pas la

croissance même après plusieurs repiquages, alors que *C. tropicalis* (qui est biotine) n'effectue guère plus de 5 générations en présence d'avidine.

B. Conditions de culture et de conservation des souches

Les cultures en milieu liquide sont faites dans des fioles de 3 l. contenant 1 l. de milieu, en fioles de 500 ml contenant 50 à 100 ml, ou en fioles de 100 ml pour 10 et 20 ml de milieu. Les fioles sont agitées à 28°C sur une table tournante sous une tente thermostatée. Pour certains milieux (contenant des paraffines) où une bonne aération est nécessaire, on utilise des fioles munies de déflecteurs latéraux pour augmenter les turbulences.

Les cultures solides sont faites sur boîtes de Pétri classiques. On s'arrange généralement pour avoir moins de 100 colonies (entre 40 et 60) sur une boîte de 9 cm de diamètre si on veut utiliser la technique des répliques, détecter des excrétions ou reconnaître des phénotypes coloniaux. Les boîtes sont incubées à 30°C, sauf pour les croisements (20 à 25°C).

Les souches sont conservées sur agar incliné à - 4°C dans des tubes à vis recouverts de parafilm. Elles sont alors repiquées tous les ans environ. Pour des conservations prolongées et après des essais malheureux sur gel de silice , on utilise un milieu liquide de type YE supplémenté par 30% de glycérol. Les suspensions de cellules dans ce milieu sont gelées à -70°C. Les diploïdes sont conservés dans les mêmes conditions sans s'haploïdiser ni perdre l'aptitude à sporuler. Par contre, certains haploïdes conservés sur agar à 4°C ont notablement évolué (apparition de suppresseurs, aneuploidisation ...).

../..

C. Mesure de la croissance en milieu liquide

Sur de petits volumes (inférieurs à 50 ml) on suit généralement la croissance par néphélométrie (néphélomètre Evans) dans des fioles à diverticule. Les fioles sont ensemencées avec environ 5 . 10^5 cellules/ml.

Sur de plus grands volumes, on peut évaluer le nombre de cellules par ml d'une dilution appropriée à l'hématimètre (chambre de Malassez, moyenne sur 20 carreaux, chacun représentant 1/100è de mm3). Dans ce cas, on traite la suspension à compter aux ultrasons (Mullard Sonifier, intensité entre pics 10 µ) pendant deux fois 30 secondes, afin de dissocier les amas ou les chaînettes. Ce traitement n'affecte pas la survie des cellules (vérification faite sur un mutant "lisse" ne formant ni amas, ni chaînettes, ni hyphes) mais altèrent les hyphes qui ne sont pas comptés (s'ils existent). On peut également mesurer la croissance par l'augmentation du poids sec des cellules par ml de culture (filtres Whatman GF/B séchés et tarés).

On peut établir pour une souche haploïde en phase exponentielle sur un milieu donné une relation assez constante entre ces trois méthodes de mesure. Cette relation est très variable selon les souches et les conditions de culture.

Dans certains cas, on s'est aussi intéressé au pourcentage de cellules viables dans une culture : on mesure alors le rapport entre le nombre "d'éléments susceptibles de donner une colonie" par étalement et le nombre de colonies réellement formées sur le milieu d'étalement. La culture est d'abord traitée aux ultrasons, puis comptée à l'hématimètre : dans ce cas, une cellule et son bourgeon, ou une chaîne de 3 cellules ou plus sont comptés comme un seul "élément susceptible de donner une colonie". Le rapport des valeurs obtenues par comptage à l'hématimètre,

et par comptage des boîtes, ou efficacité d'étalement, est voisin de 100% en phase exponentielle pour la plupart de nos souches (70% pour W29).

D. Etude des phénotypes sur boîte

La plupart des tests phénotypiques autres que les mesures de vitesse de croissance ont été faits sur boîte à milieu solide.

a) Tests en points

Le phénotype est déterminé par dépôt d'une goutte de suspension à tester (100 à 200 cellules par goutte au maximum) sur différents milieux sélectifs. Si les phénotypes sont nets, en particulier s'il n'y a pas d'effet de la densité d'ensemencement ou de croissance résiduelle importante, on peut aussi prélever directement un inoculum sur boîte avec un cure-dent stérile et en déposer une fraction sur les différents milieux tests.

b) Répliques

Cette technique, couramment utilisée sur les levures, n'est vraiment efficace que si l'on dispose d'étalements homogènes par la taille et la texture, ce qui est loin d'être le cas ici : après une mutagénèse ou un isolement de spores provenant d'un diploïde non "amélioré" (voir 2è partie), on obtient des colonies de tailles très variées dont la texture et la forme se prêtent mal à la réplique (colonies à surface dure, colonies "envahissantes" à croissance radiale rapide, etc...) Deux techniques ont été mises en oeuvre dans les cas où le velours s'avérait inutilisable : la technique des aiguilles (où une brosse en fer ou un pique-fleurs métallique du diamètre de la boîte remplace le velours) qui permet 2 à 3 répliques seulement et surtout celle des matrices intermédiaires. Dans ce cas, on transfère

2 à 300 colonies au cure-dent des boîtes mères sur des boîtes du même milieu qu'on incube une nuit à 30° avant de les répliquer par la technique des velours: les phénotypes coloniaux gênants n'ont en général pas le temps de s'exprimer. Par ailleurs, en prélevant une très petite partie de chaque colonie sur les boîtes mères, on minimise les chances d'avoir un clone mixte dans le cas d'isolement de spores en masse. Enfin en disposant régulièrement les colonies, on atténue les effets de compétition qui peuvent limiter la croissance.

c) Détection des excrétions

Elle se fait qualitativement par la méthode classique des souches indicatrices. La souche indicatrice (exigeante par exemple en lysine si on veut détecter une excrétion de cet acide aminé) est cultivée sur milieu N5000 supplémenté, récoltée en phase exponentielle puis lavée deux fois par centrifugation dans ce même milieu non supplémenté et resuspendue à raison de 5.10^5 cellules/ml dans du milieu N5000 gélosé maintenu en surfusion à 40°C. La suspension est alors rapidement coulée en boîtes de Pétri, on y déposera au cure-dent ou par étalement, la souche à tester. La souche indicatrice effectue généralement 1 ou 2 divisions dans ce milieu et ne continue à croître que si les souches testées excrètent le ou les facteurs de croissance requis. La taille du halo donne une idée de l'intensité de l'excrétion. Pour que cette méthode soit efficace, deux conditions sont requises : présence en quantité suffisante des sources de carbone et d'azote afin que la croissance des cellules indicatrices et celle des souches testées y soient possibles, absence d'effets parasites dus aux souches testées (celles-ci forment des hyphes sous la gélose et après quelques jours de petits satellites apparaîssent en bout d'hyphe qui miment le phénotype recherché). On s'arrange donc pour ne tester

qu'un maximum de 30 à 40 colonies par boîte et on vérifie les phénotypes excréteurs en transférant les colonies présumées excrétrices sur une boîte indicatrice recouverte d'une feuille de cellophane stérile (on peut aussi étaler directement sur cellophane).

d) Détermination d'un besoin inconnu

1. Après mutagénèse d'une souche et étalement sur YE, on obtient un certain nombre de colonies incapables de croître sur N5000 (voir plus bas). Après deux réisolements successifs, 5 sous-clones environ de chaque colonie présumée mutante sont testés en point sur N5000 supplémenté (MM Vit, MM Nuc, MM Cas). Pour déterminer les besoins d'une souche poussant sur MM Nuc, on la teste dans une deuxième étape sur adénine, uracile, guanine, cytosine et hypoxanthine. Dans le cas d'une souche poussant sur MM Casa, on utilise la grille de 9 milieux décrite ci-dessous :

	A	B	C	D
I	gly	asn	gln	met
II	leu	asp	tyr	glu
III	ser	arg	lys	ileu
IV	phe	thre	cys	trp
V	ala	his	val	cys-cys

Chaque ligne et chaque colonne correspond à un milieu supplémenté par les acides aminés indiqués. Un mutant lys$^-$ poussera donc sur C et III.

On obtient très rarement des mutants présentant plusieurs exigences en acides aminés.

2. Lorsque le nombre des besoins à tester est limité (analyses de spores en vrac) on réplique les boîtes mères ou les matrices intermédiaires sur milieux sélectifs. Afin de limiter le nombre de ces répliques, on procède comme suit :

../..

- 2 besoins a et b : répliques sur MM + a et MM + b
- 3 besoins a,b et c : répliques sur MM + ab, MM + ac, MM + bc
- 4 besoins a,b,c et d : répliques sur MM + abc, MM + abd , MM + acd, MM + bcd.

Il n'y a pas de témoin de répliques, les colonies répliquées qui ne se développent pas laissent une trace très nette.

III. TECHNIQUES GENETIQUES

A. Mutagénèse et enrichissement en mutants

On a surtout utilisé les rayons ultraviolets (lampe germicide Mazda) et le N nitro N' nitrosométhyluréthane (NMU) pour induire des mutations. Les mutants sont éventuellement sélectionnés à la nystatine.

a) Mutagénèse UV

La souche est repiquée sur milieu YE et cultivée 24 H, puis resuspendue dans de l'eau distillée à raison de 10^5 cellules/ml. 5 ml de la suspension obtenue sont versés dans une boîte de Pétri (5 cm de diamètre) et soumis à une dose totale de 2000 ergs/mm2 (1 min. d'exposition si la lampe est maintenue à 36 cm de la boîte). On agite la suspension doucement pendant l'exposition en faisant tourner la boîte. La survie (5 à 20%) varie d'une souche à l'autre et d'une expérience à l'autre.

b) Mutagénèse au NMU

La souche est précultivée sur N5000 liquide (éventuellement supplémenté) et récoltée en phase exponentielle. Après lavage, on resuspend les cellules dans une solution aqueuse de NMU 5.10^{-6} (v·v) et on agite vigoureusement

la suspension pendant 1 H. à 25°C. Les cellules traitées sont alors lavées 3 fois à l'eau physiologique. La survie dépend beaucoup de l'efficacité de ces lavages, elle est voisine de 10% dans ces conditions.

c) Enrichissement en mutants par traitement à la nystatine

Les cellules, traitées ou non par l'un quelconque de ces mutagènes, sont ensemencées sur YE liquide à raison de 10^6 cellules/ml, et on attend que la densité de la culture augmente (entre une nuit et deux jours selon les souches et les traitements). La culture est alors lavée à l'eau distillée et resuspendue (10^7 cellules/ml) en N_o liquide pendant 8 H: Ce traitement a pour but de diminuer les concentrations intracellulaires d'acides aminés libres et d'éviter une croissance résiduelle des mutants sur milieu sélectif. On ajoute alors une solution stérile de sulfate d'ammonium (concentration finale : 5 g/1) et après un doublement, on ajoute une solution de nystatine dans l'alcool (concentration finale 10 mg/1). Après I H.30 d'incubation, on élimine par lavage à l'eau physiologique la nystatine : la survie est voisine de $1/10^4$, mais dépend beaucoup du stock de nystatine utilisé. On étale donc entre 5.10^5 et 5.10^6 cellules sur 20 boîtes de milieu sélectif pour les mutants recherchés. Dans les meilleurs cas, on obtient plus de 50% d'auxotrophes, toutes classes confondues.

B. Isolement des diploïdes

Bien qu'il soit possible d'isoler au micromanipulateur les zygotes formés dans une confrontation (Herman 1971), nous n'avons pas utilisé cette technique; les diploïdes ont été sélectionnés par prototrophie sur un fond de parents auxotrophes. Cette technique n'est utilisable que si les parents ne réversent pas trop et s'il n'y a pas de syntrophie. Les témoins nécessaires et les croisements sont aisément réalisés

pour un grand nombre de confrontations par la technique des "copies croisées" : les intersections fertiles fournissent les diploïdes, les autres des témoins de syntrophie, et le reste sert de témoin de réversion.

Cette technique sert également à déterminer le signe d'une souche inconnue et à réaliser un test de complémentation fonctionnelle, (recherche de doubles mutants dans la descendance de deux mutants de même phénotype). Dans ce dernier cas on est obligé d'utiliser des souches portant, en plus des mutations à tester, des marqueurs d'auxotrophie complémentaires : le diploïde est d'abord sélectionné entre ces marqueurs accessoires sur un milieu non sélectif pour les mutations intéressantes, et soumis ensuite au test phénotypique d'allélisme.

a) Technique des copies croisées

Les souches sont incubées une nuit en stries parallèles sur PSM à 30°C, répliquées en croix sur YM et incubées 4 jours à 20 - 25°C, puis répliquées sur milieu sélectif (N5000 généralement). Les diploïdes apparaissent sous forme de clones plus ou moins isolés aux intersections fertiles en 2 ou 3 jours. Ils ne sporulent pas sur N5000 avant une semaine ou plus. L'efficacité de cette technique sera discutée au chapitre II.

b) Isolement en masse

Dans certains cas (souches non auxotrophes) cette sélection est impossible. On peut alors partir d'une confrontation sur YM et l'étaler sur V8C. Les sous-clones qui brunissent sur ce milieu(environ 1 pour 1000 pour des souches très réactives) sont diploïdes. On les strie alors sur YE et 10 sous-clones sont retestés sur YE et V8C : ceux qui sont bruns sur V8C sont alors repris de YE et conservés.

../..

C. Analyse des diploïdes

En dehors de la méthode de dissection des asques (Bassel et al. 1971) et de l'haploïdisation par la pFPA que nous avons peu utilisées, deux autres méthodes seront décrites :

a) Analyse de spores en masse :

Une grosse anse de platine d'un diploïde incubé une semaine sur V8C à 25°C et resuspendue dans 5 ml de tampon 0,1 M TRIS citrate pH 5,0 contenant 15 ml de chlorhydrate de cystéine par ml, puis soniquée dans la glace fondante pendant 30 sec. pour dissocier les amas. On ajoute alors une ampoule de suc digestif d'Hélix Pomatia (1 ml, Industries Biologiques Françaises, 92 Gennevilliers) et environ 10 mg de β glucuronidase(Sigma). L'ensemble est agité 3 h. à 37°C au bain marie (Newbrunswick Aquatherm 300 rpm), puis lavé trois fois et repris dans 1 ml d'eau distillée. La suspension contient alors essentiellement des spores libres, des débris de cellules végétatives entières, (voir photo 8). Ces dernières sont pratiquement éliminées par un traitement à l'huile de paraffine ou à l'héxadécane (1 ml d'huile paraffinique pour 0,5 ml de suspension soniquée) : après émulsion des deux phases, on les resépare par centrifugation ménagée : la phase supérieure paraffinique ne contient que des spores, la phase inférieure contient des spores, des asques non digérés, des cellules végétatives et des débris (L. Clavillier 1962). On constate qu'en moyenne un spore pour 10^4 passe dans la phase supérieure. Celle-ci est diluée dans l'hexadécane et étalée sur milieu solide (généralement N5000 supplémenté). Les clones sporaux apparaissent en deux jours à 30°C.

Cette technique permet d'évaluer des fréquences de recombinaison voisines de 10^{-4} moyennant un certain nombre de précautions. Trois facteurs principaux peuvent en effet affecter son efficacité. L'activité des préparations

d'enzyme d'escargot varie souvent; si elle est faible, la paroi des cellules végétatives n'est pas suffisamment fragilisée pour qu'elles soient fragmentées par sonication et le nombre de cellules végétatives peut rester élevé : certaines passent alors dans l'huile de paraffine. On a constaté que dans ce cas, les hyphes étaient également abondants : il suffit de prolonger le traitement par l'enzyme (ou d'en rajouter) jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'hyphes entiers. La séparation des phases aqueuse et paraffinique est parfois difficile pour des raisons inconnues ; un second traitement de la phase aqueuse par la paraffine permet souvent d'obtenir une bonne séparation. On contrôle éventuellement au microscope la contamination de la phase supérieure par des gouttes d'eau. Le dernier facteur est plus difficile à contrôler : il se forme parfois des amas de spores (2 à plus de 10) après traitement par l'enzyme; ces amas ne sont pas dissociés (ou plus vraisemblablement se reforment) après sonication. L'addition d'EDTA 5.10^{-4} (concentration finale) avant la sonication permet souvent d'obtenir une bonne dissociation des amas sans affecter ultérieurement la séparation des spores par l'huile de paraffine. Par ailleurs on trouve toujours nettement moins d'amas dans la phase paraffinique que dans la phase aqueuse. Il est bien entendu nécessaire d'éliminer tous les diploïdes qui forment un nombre élevé d'asques à 2 spores, celles-ci pouvant être binucléées.

Si l'on veut uniquement tester l'existence d'une liaison entre marqueurs, on peut supprimer l'étape d'extraction des spores à la paraffine, à condition de s'assurer de l'absence de cellules végétatives et d'amas de spores après la sonication.

L'étude d'un cycle complet comprenant l'isolement d'un diploïde par prototrophie, sa sporulation et l'étude de sa descendance puis la réobtention d'un diploïde, exige environ 30 jours. Cette durée peut être réduite de moitié par isolement des zygotes et des ascospores au micromanipulateur

b) Conversions mitotiques induites par les rayons γ

Dès leur apparition, on prélève à l'aiguille, sur boîte de croisements, trois clones présumés diploïdes auxotrophes pour chaque confrontation analysée, et on les ensemence simultanément sur V8C en points et sur milieu liquide N5000 supplémenté (10 ml). Chaque culture est répartie après trois jours d'incubation à 28° entre 5 tubes à vis stériles (1,8 ml par tube) et soumise à des doses sublétales de rayonnement : 0,1,2,3,4,6 KR émises par une source de ^{60}Co (Institut Français du Radium). Les suspensions traitées sont étalées sur N5000 supplémenté à la dilution 10^{-5} et sur N5000 non supplémenté aux dilutions 10^{0} et 10^{-1} (4 boîtes par dilution). Les boîtes sont incubées 4 jours à 25°C et on ne compte que les séries correspondant à un clone qui a bruni sur V8C (diploïde). Les "réversions" présentes à la dose zéro sont déduites des comptages suivants, la létalité du traitement étant généralement faible (moins de 4%). On porte alors le nombre de diploïdes "révertants" pour 10^{6} cellules étalées en fonction de la dose. On obtient une droite dont la pente a la dimension d'une fréquence x dose^{-1} les valeurs obtenues pour trois allèles dans les trois combinaisons possibles permettent de déduire l'ordre et la distance relative de ces allèles entre eux. Dans tous les cas étudiés, aucune correction pour les réversions d'un diploïde homozygote n'a été nécessaire: celles-ci ne sont pas significativement accrues par les rayons γ (pente inférieure à $2 .10^{-6}$ prototrophe/KR).

D. Nomenclature et souches utilisées

La plupart des mutants obtenus ont dû être croisés à des souches de référence avant qu'on puisse les étudier (isogénisation partielle et introduction de marqueurs auxiliaires). Les souches résultantes ont reçu un nom de laboratoire qui rappelle le diploïde de départ. Cette terminologie ne présente pas d'autre intérêt que de distinguer des souches au

"back-ground" génétique différent, elle ne sera pas détaillée : en dehors des mutants de départ, chaque souche sera désignée par son génotype connu.

La liste des principaux mutants utilisés est présentée dans le tableau 1, leur position est précisée sur le tableau 2. On a utilisé les symboles suivants :

- Souches	: - Symbole du caractère suivi du numéro d'isolement	lys13
	- Nom du laboratoire suivi du génotype	105-1 (ura2)
- Locus	: - Entre parenthèses, symbole du caractère suivi du numéro du locus et d'un point	(lys1.)
- Allèles	: - Entre parenthèses, symbole du locus suivi du numéro d'isolement du mutant portant cet allèle	(lys1.13)
	- L'allèle dominant est indiqué en majuscules	(LYS1.5)
	- L'allèle sauvage est suivi de +, on utilise le signe + s'il n'y a pas d'ambiguité	(LYS1.13^{+})
- Phénotypes	- Symbole du caractère suivi de + pour le phénotype sauvage	lys^{+}
	de - pour le phénotype mutant	lys^{-}
- Génotypes	- Entre parenthèses, succession des allèles séparés par ,	(A,lys1.13, his1.1)
- Croisement	- Noms des souches séparés par x	lys12x1905-18 (lys1.13)
- Diploïdes	- Entre parenthèses, génotypes des parents séparés par /	(A,lys1.13, his1.1/B, lys3.12)

../..

Tableau 1 - Liste des principaux mutants utilisés

Nom	Origine	Souche de départ	Locus	Caractéristiques
Marqueurs morphologiques				
bw3	spontané	his1	(bw3.)	Récessif, culture et gélose marron foncé
col1	spontané	W29	(col1.)	Récessif, très lié à (his1.), colonies blanches à "peau" dure
col2	spontané	mg5	(col2.)	Récessif, coloration rose de la culture, renforcée par (ade1.)
Marqueurs d'auxotrophie auxiliaires				
his1	UV	W29	(his1.)	Besoin en histidine, lié au signe (20%)
ade1	spontané	mg5	(ade1.)	Besoin en adénine; (ade1.,his1.)et rouge
ura21	UV	Z30	(ura2.)	Besoin en uracile
ura1	UV	W29	(ura1.)	Besoin en uracile, très lié à (lys1.)
arg1	UV	W29	(arg1.)	Besoin en arginine
arg4	NMU	W29	(arg2.)	Besoin en arginine, lié à (lys1.)
pyr1	UV	Z30	(ura3.)	Besoin en uracile ou cytosine
Marqueurs de résistance				
x1 et x6	spontanés	9301-14 (LYS1.5,ade1.)	(aec1.)	Récessif, résistance à l'aminoéthyl-cystéine dans une souche (LYS1.5)
x4 et x12	spontanés	9301-14	(aec2_1.)	Récessif, résistance à l'aminoéthyl-cystéine dans une souche (LYS1.5)
x3 et x9	spontanés	9301-14	(aec2_2.)	Récessif, résistance à l'aminoéthyl cystéine
x11 et x17	spontanés	9301-14	(aec2_3.)	Récessif, résistance à l'aminoéthyl-cystéine peut être identique à (aec1.)
mg5	spontané	W29	(lys1.)	semi-dominant, résistance à la transdéshydrolysine

Nom	Origine	Souche de départ	Locus	Caractéristiques
Marqueurs de la biosynthèse de la lysine				
lys1	UV	W29	(lys1.)	Homocitrate synthétase $^-$
lys2	UV	W29	(lys7.)	Avant α aminoadipate
lys3	UV	W29	(lys6.)	Avant α aminoadipate, lié à (lys3.) (20%)
lys4	UV	W29	(lys1.)	Homocitrate synthétase$^-$
lys5	UV	W29	(lys2.)	Aminoadipate réductase$^-$ très lié et peut-être identique à (lys3.)
lys7	UV	W29	(lys1.)	Homocitrate synthétase$^-$
lys8	UV	W29	(lys1.)	Homocitrate synthétase$^-$
lys9	UV	W29	?	Aminoadipate semialdéhyde glutamate réductase $^-$
lys10	NMG	W29	(lys1.)	Homocitrate synthétase$^-$
lys11	NMU	Z30	(lys8.)	Avant aminoadipate
lys12 (digénique)	UV	Z30	(lys3.)	Aminoadipate réductase$^-$
			(lys5.)	Saccharopine déshydro - génase$^-$
lys13	UV	Z30	(lys1.)	Homocitrate synthétase$^-$
lys14 (digénique)	UV	Z30	(lys3.)	Aminoadipate réductase$^-$
			(lys4.)	Aminoadipate semi-aldéhyde glutamate réductase$^-$
lys15	NMU	103.1(arg1.)	(lys2.)	Aminoadipate réductase$^-$
lys16	NMU	103.1	(lys1.)	Homocitrate synthétase$^-$
lys17	NMU	103.1	(lys9.)	Avant aminoadipate
lys18	spontané	105.1(ura2.)	(lys3.)	Aminoadipate réductase$^-$
lys19	spontané	105.1	(lys6.)	Avant aminoadipate
lys20	spontané	105.1	(lys3.)	Aminoadipate réductase$^-$
lys21	spontané	105.1	(lys1.)	Homocitrate synthétase$^-$
lys22	spontané	105.1	(lys10.)	Avant aminoadipate
lys23	spontané	132-4 (LYS1.5,lyc1.5)	(lys11.)	Homocitrate synthétase$^-$, suppresseur de (lyc1.5) non lié à (lys1.)

Nom	Origine	Souche de départ	Locus	Caractéristiques
Marqueurs de la dégradation de la lysine				
lyc5 et 10	UV	W29	(lyc1.)	Lysylacétyltransférase⁻? très lié à (lys5.)
lyc33	UV	8041-3 (his1.)	(lyc1.)	Lysylacétyltransférase⁻?
lyc38, 40 et 42	UV	105-2 (ura2.)	(lyc2.)	N-6-acétyllysine ε déaminase ?
lyc1	UV	W29	(lyc3.)	Avant 5-aminovalérate.
lyc18	UV	mg-5	(lyc4.)	Avant 5-aminovalérate
lyc22 et 32	UV	8041-2 (his1.)	(lyc5.)	Avant 5-aminovalérate
lyc43	UV	W29	(lyc6.)	5-aminovalérate déaminase ?
lyc44 et 45	UV	mg-5	(lyc6.)	5-aminovalérate déaminase ?
lyc15 et lyc16	UV	mg-5	(lyc7.)	Après 5-aminovalérate
lyc14	UV	mg-5	(lyc8.)	Après 5-aminovalérate

Tableau 2 - Etapes du métabolisme de la lysine affectées : relations géniques

Etape affectée	gène	allèles
α cétoglutarate → homocitrate	(lys1.) (lys11.)	1.1, 1.4, 1.5, 1.7, 1.8, 1.10, 1.13, 1.16, 1.21, 11.23
homocitrate → → aminoadipate (5 étapes?)	(lys6.) (lys7.) (lys8.) (lys9.) (lys10.)	6.3, 6.19 7.2 8.11 9.17 10.22
aminoadipate → → aminoadipate semialdéhyde (3 étapes)	(lys2.) (lys3.)	2.5, 2.15 3.12A, 3.14A, 3.18, 3.20
aminoadipate semialdéhyde → saccharopine	(lys4.)	4.14B (+ lys9 ?)
saccharopine → lysine	(lys5.)	5.12B
lysine $\overset{?}{\rightarrow}$ N-6-acétyllysine	(lyc1.)	1.15, 1.10, 1.33
N-6-acétyllysine $\overset{?}{\rightarrow}$ N-6-acétamidocaproate	(lyc2.)	2.38, 2.40, 2.42
N-6-acétamidocaproate → → 5-aminovalérate (2 étapes ?)	(lyc3.) (lyc4.) (lyc5.)	3.1 4.18 5.22, 5.32
5-aminovalérate $\overset{?}{\rightarrow}$ glutarate semialdéhyde	(lyc6.)	6.43, 6.44, 6.45
glutarate semialdéhyde → → source C (n étapes)	(lyc7.) (lyc8.)	7.15, 7.16 8.14

On a marqué (?) les étapes hypothétiques

IV. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

A. Récolte des cellules et préparation des extraits enzymatiques.

Les cultures sont faites en erlens de 3 l. contenant 1 l. de milieu, ensemencés avec environ 10^9 cellules provenant d'un repiquage de la souche à tester effectué la veille sur YE. Les erlens sont agités sur une table rotative thermostatée à 28-30°C.

Les cultures sont arrêtées par centrifugation à 0°C quand la densité cellulaire atteint ou dépasse 5.10^7 cellules par ml (environ 5 à 6 générations). Les cellules sont lavées deux fois avec de l'eau distillée et la suite des opérations est poursuivie à une température voisine de 0°C. Les cellules sont resuspendues dans leur volume de tampon d'extraction. On a essentiellement utilisé deux types de tampons d'extraction:

- Tampon 1 (homocitrate synthétase) : 0.05 M tampon TRIS HCl pH 7,4, glycérol 20%, fluorure de phénylméthylsulfonate (FPMS) 1 mM.

- Tampon 2 (aminoadipate réductase, aminoadipate semialdéhyde glutamate déshydrogénase, saccharopine déshydrogénase) : 0,05 M tampon phosphate de potassium pH 7,2, éthylène diamine tétraacétate (EDTA) 10^{-4}M, glutathion réduit 10^{-3}M, FPMS 1 mM, glycérol 20%.

Les cellules sont broyées avec deux fois leur poids de billes de verre dans un homogénéiseur Braun refroidi par la neige carbonique. L'extrait obtenu est centrifugé à 57 000 g (30 000 tpm, rotor 50, Beckman Ultracentrifuge) pendant 45 min. Il est éventuellement dialysé contre un tampon voisin du tampon d'extraction pendant 3 H. (la molarité du tampon seule est diminuée environ de moitié). Des temps de dialyse plus longs n'améliorent ni l'activité des enzymes ni leur sensibilités à d'éventuels inhibiteurs. On a en particulier vérifié

../..

que la lysine ou l'acide 2-aminoadipique qui sont accumulés par certains auxotrophes étaient effectivement éliminés par ce procédé. La suppression du FPMS dans les tampons a des effets néfastes sur la conservation de la saccharopine déshydrogénase et sur la sensibilité de l'homocitrate synthétase à la rétroinhibition par la lysine; elle est sans effet sur les autres activités testées (voir tableau III). Les extraits sont conservés dans la glace fondante.

Tableau III. Effets du FPMS

Enzyme testé	FPMS	4°C conservation (% activité spécifique)					Sensibilité à la lysine (10^{-3}) % inhibition
		0j.	1j.	2j.	5j.	7j.	
Homocitrate synthétase	Non	100	100	100	95		70 (variable)
	Oui	100	106	100		94	100
Saccharopine déshydrogénase	Non	70	50	30		5	47
	Oui	100	100	98	96		53

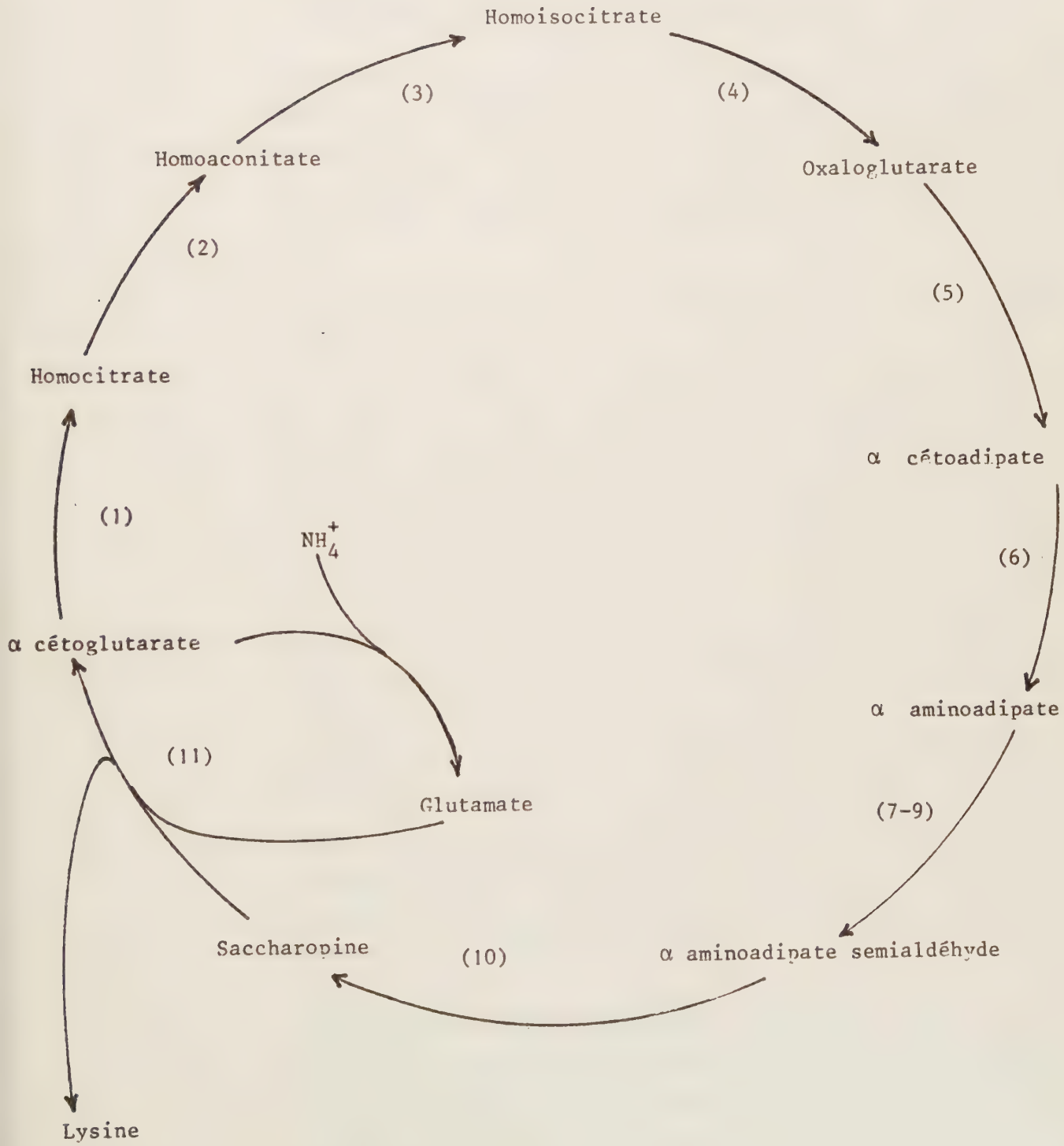
Les protéines sont déterminées par la méthode de Lowry et al. (1951) avec une gamme de lysozyme (sans correction).

B. Dosages enzymatiques

Nous n'avons cherché à doser que les enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse de la lysine dont on trouvera une représentation schématique sur la figure 2.

../..

Fig. 2 Schéma de la voie de biosynthèse de la lysine



On a indiqué entre parenthèses les étapes enzymatiques impliquées (voir fig. 15, page 85).

a) Dosage de l'homocitrate synthétase (EC 4.1.3.21)

L'homocitrate synthétase (HS), ou acétylcoenzyme A : 2-cétoglutarate C acétyl transférase, catalyse la réaction suivante :

2-cétoglutarate + AcCoA → Homocitrate + CoASH.

Nous avons utilisé une modification de la méthode de Srere et al. (1963) mise au point pour la citrate synthétase : on mesure l'absorption à 412 nm du produit formé entre le CoASH libéré par la réaction et l'acide dithio 5-5' bisnitrobenzoïque (DTNB).

Le mélange réactionnel standard comprend : un tampon phosphate de potassium pH 7,4 (150 mM), de l'acide 2-cétoglutarique neutralisé par KOH (50 mM), du $MgCl_2$ (0,5 mM), du CoASAc (2 mM) et une quantité d'enzyme telle que sont respectées les conditions de linéarité (0,3 mg/cc de protéines dans nos conditions). Le volume des incubations a été progressivement réduit à 300 µl pour économiser le CoASAc. Les incubations sont faites à 25°C pendant 10 min. pour tous les extraits, sauf spécification contraire. La réaction est arrêtée par addition d'acide sulfurique concentré (1/20è du volume réactionnel). Le surnageant obtenu après décantation des protéines est dilué au dixième dans une solution de DTNB 0,1 M dans du TRIS 1 M. La densité optique du produit jaune formé est lue à 412 nm dans un spectrophotomètre thermostaté à 25° contre un blanc sans α cétoglutarate. On s'est assuré que les vitesses mesurées correspondaient bien à des vitesses initiales.

L'optimum de pH de la réaction est situé entre pH 7,5 et pH 8,2. Le besoin en ions Mg^{++} n'est pas absolu avec un extrait dialysé, bien qu'une stimulation de l'activité (+ 10%) ait parfois été observée. L'activité est sensible à l'EDTA (demi inhibition à 15 mM) et aux réactifs des

groupements SH (pCMB, DTNB), ce qui explique qu'on n'ait pu suivre en continu l'apparition du CoASAc par le DTNB.

b) Dosage du système adminoadipate réductase (AAR) EC 1.2.1.31

Ce système catalyse la transformation du 2-aminoadipate en 2-aminoadipate semialdéhyde (AASA). Les systèmes enzymatiques impliqués sont mal connus, Sagisaka et Shimura (1960) ont déterminé les besoins du système et proposé le schéma réactionnel suivant :

(1) : αAA + ATP → ∂ adényl-αAA + PP

(2) : αAA -AMP + $NADPH_2$ → αAA-H_2 - AMP + NADP

(3) : αAA-H_2-AMP + H_2O → AASA + AMP

Les intermédiaires de la réaction sont probablement instables et fugaces (Sinha et Bhattacharjee 1971) et aucune accumulation de dérivés adénylés de l'aminoadipate n'est décelable (voir cependant Mattoon et al. 1961). On est donc obligé de doser les étapes en série : (1), (1)+(2), (1)+(2)+(3).

- Absence de test enzymatique pour la première étape (activation)

La méthode d'échange des pyrophosphates radioactifs (Hoagland 1956) ne nous étant pas accessible, nous avons essayé de détecter la formation d'un dérivé adénylé de l'αAA par chromatographie ou par piégeage du produit par l'hydroxylamine (méthode de Lipman et Tuttle 1945). On a fait varier les conditions d'extraction, de dosage, essayé différents cofacteurs et un système générateur d'ATP (les extraits contenaient une forte activité ATPasique). Il faut noter que même dans les conditions optimales définies pour la série (1)+(2) (voir ci-dessous) aucune mesure de l'étape d'activation n'a été possible, en présence ou en l'absence de $NADPH_2$, sur des extraits de la souche sauvage ou de mutants affectés dans l'une des 3 réactions postulées.

../..

- Dosage de la série (1)+(2) (activation et réduction)

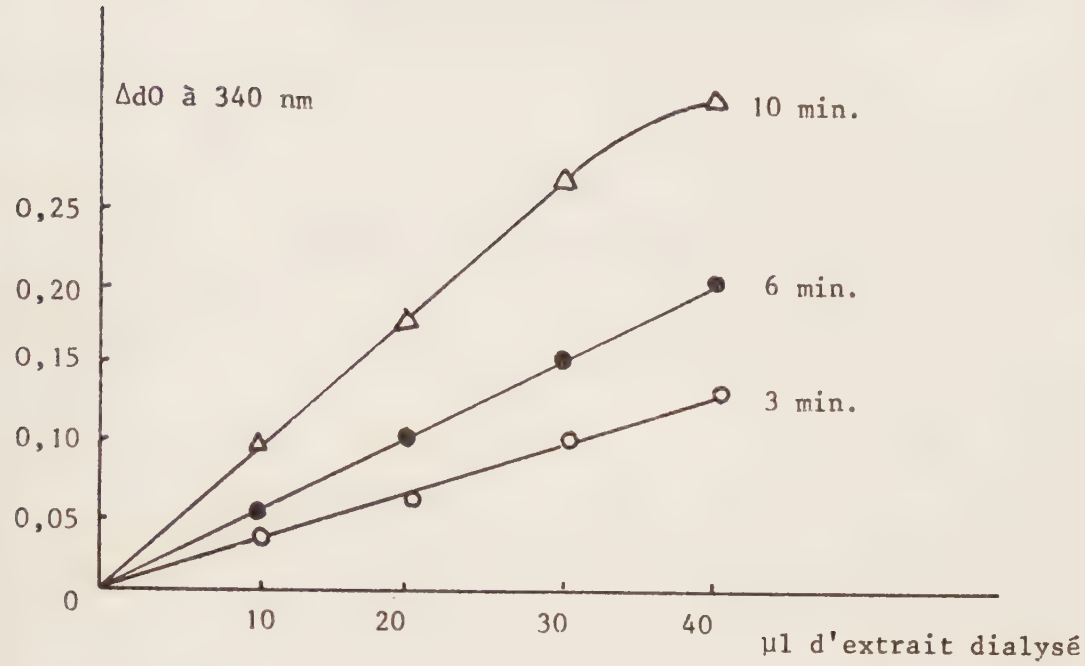
On suit l'oxydation αAA dépendante du $NADPH_2$ en présence d'ATP. Quand seule cette réaction est étudiée, on extrait les cellules dans un tampon sans EDTA,de composition : TRIS HCl 0,01 M pH 8,0, $MgCl_2$ 1 mM, GSH 1 mM, glycérol 20% et on dialyse contre ce même tampon. Le mélange réactionnel standard comporte : tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,2 (400 µl), 100 mM $MgCl_2$ (40 µl), glutathion réduit (100 µl d'une solution à 1,6 mg/cc), 60 mM ATP (200 µl), 10 mM $NADPH_2$ (20 µl), αAA 50 mM (400 µl), extrait correspondant à 0,3 mg/cc (d'habitude 20 µl) et eau qsp 2 ml.

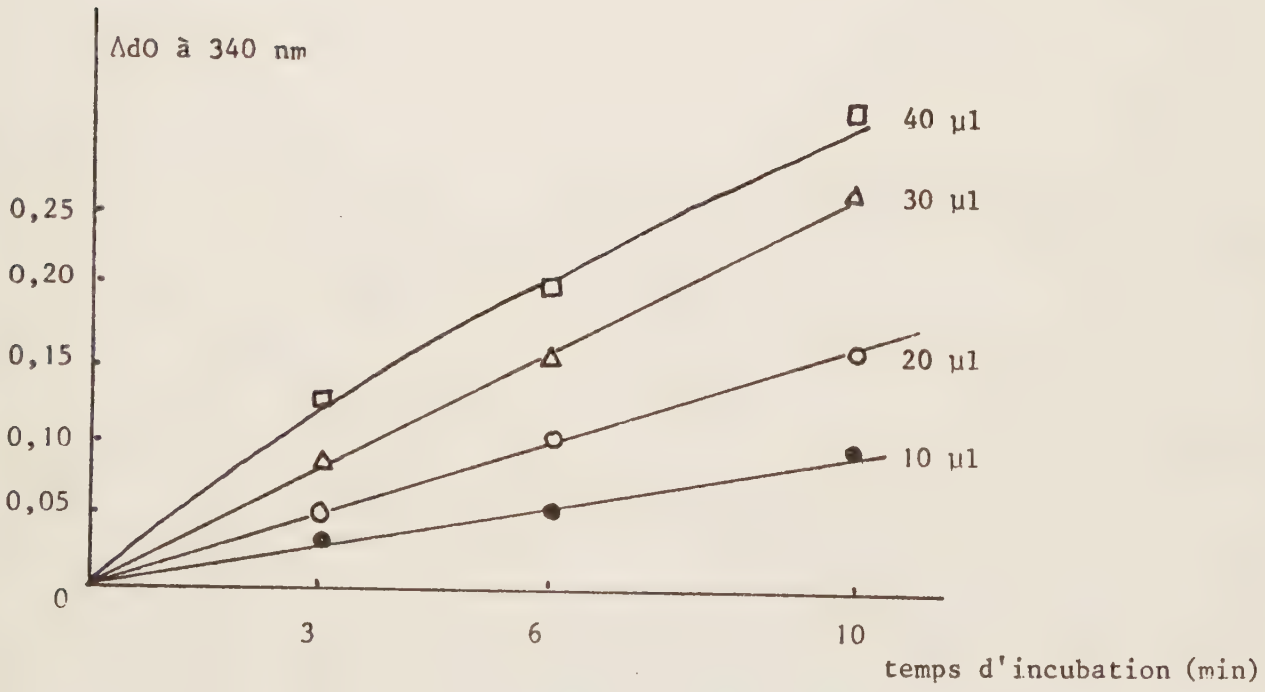
La réaction est suivie en continu à λ = 340 nm dans un spectrophotomètre thermostaté à 25°C contre un blanc sans αAA. On peut définir des conditions dans lesquelles la consommation de $NADPH_2$ varie linéairement en fonction du temps et de la quantité de protéines (voir fig.3) L'optimum de pH se situe entre pH 7,0 et pH 7,0 et pH 7,5 en tampon phosphate, les résultats sont moins bons en tampon TRIS. La réaction est complètement inhibée par 10 mM EDTA; l'inhibition est entièrement réversible par un excès d'ions Mg^{++} et, dans une moindre mesure, par Ca^{++}, Zn^{++} et Mn^{++}.

La saturation par les substrats est de type michaelien pour l'αAA et l'ATP (voir fig.4) On peut déterminer les constantes $S_{0,5}$ de demi saturation du système pour les substrats : 0,6 mM pour l'αAA et 1,5 mM pour l'ATP (il y a inhibition par excès d'ATP). Les courbes de saturation par le $NADPH_2$ sont peu reproductibles : on ne peut pas définir de demi saturation, ce qui peut s'interpréter en supposant que dans cette réaction couplée, l'étape limitante est la formation d'αAA-AMP. Si on ne peut pas accumuler ce composé (en l'absence de $NADPH_2$) - voir partie 3, I, D - , on n'est jamais à saturation de

../..

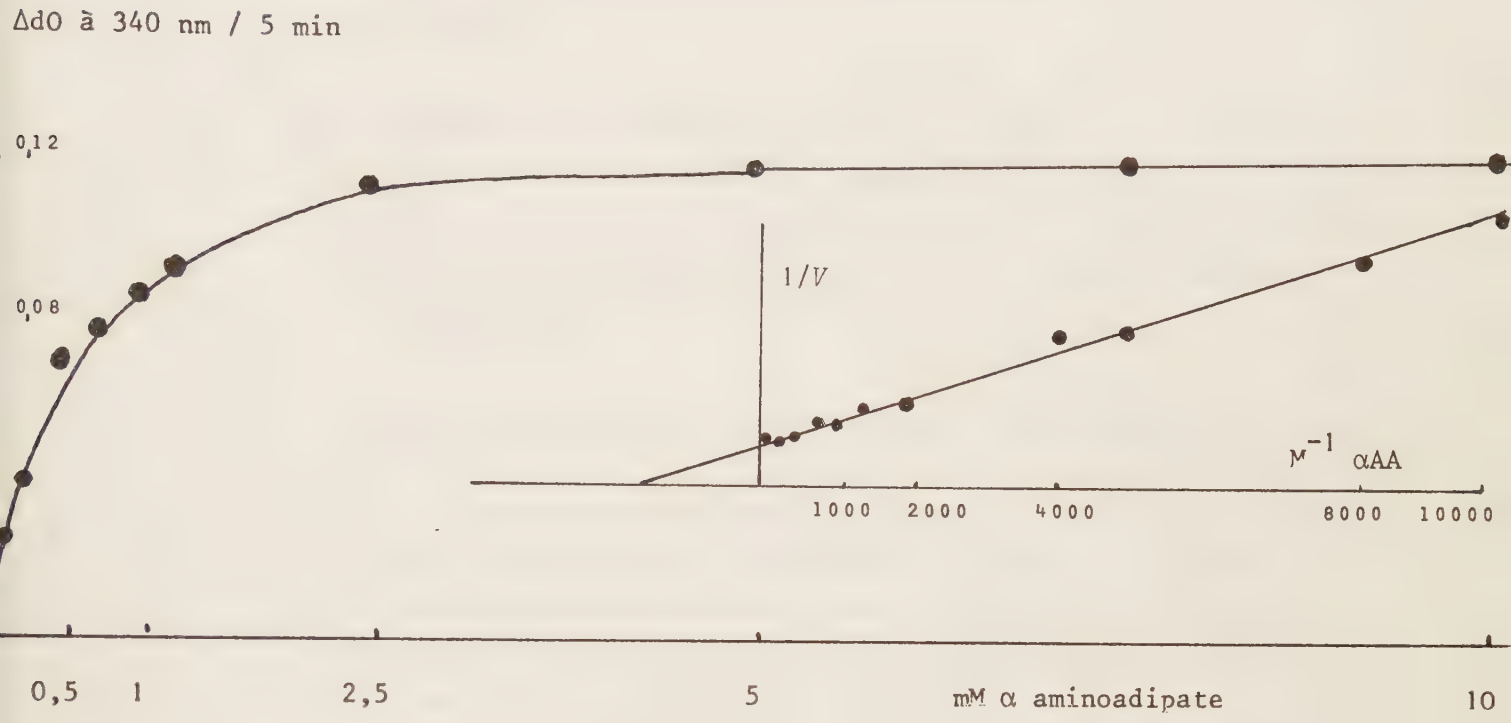
Fig.3 Linéarités du dosage de l'aminoadipate réductase (1+2).

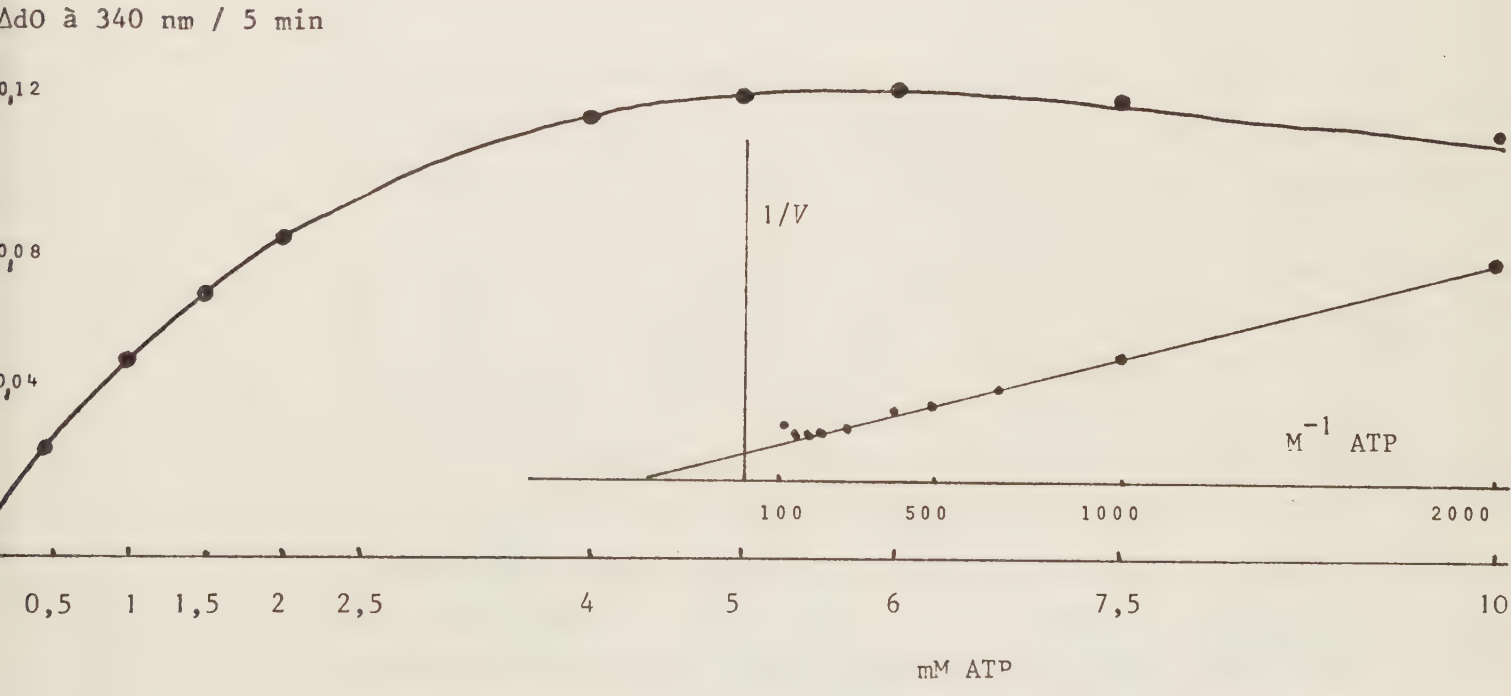




Linéarités du dosage de l'AAR en fonction de la quantité d'enzyme (en haut) et du temps d'incubation (en bas). Extrait de la souche W 29. Pour les conditions du dosage par l'oxydation du $NADPH_2$, voir texte.

Fig. 4 Saturation de l'aminoadipate réductase de la souche sauvage W 29 par ses substrats: ATP et αaminoadipate.





Courbes de saturation de l'α aminoadipate réductase, mesurée par la méthode au $NADPH_2$, voir texte, par l'α aminoadipate (en haut) et par l'ATP (en bas). On a donné dans chaque cas en encart la représentation des inverses (Lineweaver-Burk).

la réductase pour l'αAA-AMP et il est impossible de mesurer une demi saturation de l'enzyme par le $NADPH_2$. Le $NADH_2$ et le GTP ne peuvent pas remplacer le $NADPH_2$ et l'ATP.

L'enzyme est stable pendant une semaine au moins à 4°C (moins de 10% de perte d'activité). Il est par contre très sensible à la température (voir fig.5). On n'a pas essayé de purifier cette activité (voir cependant tableau 4, page 37).

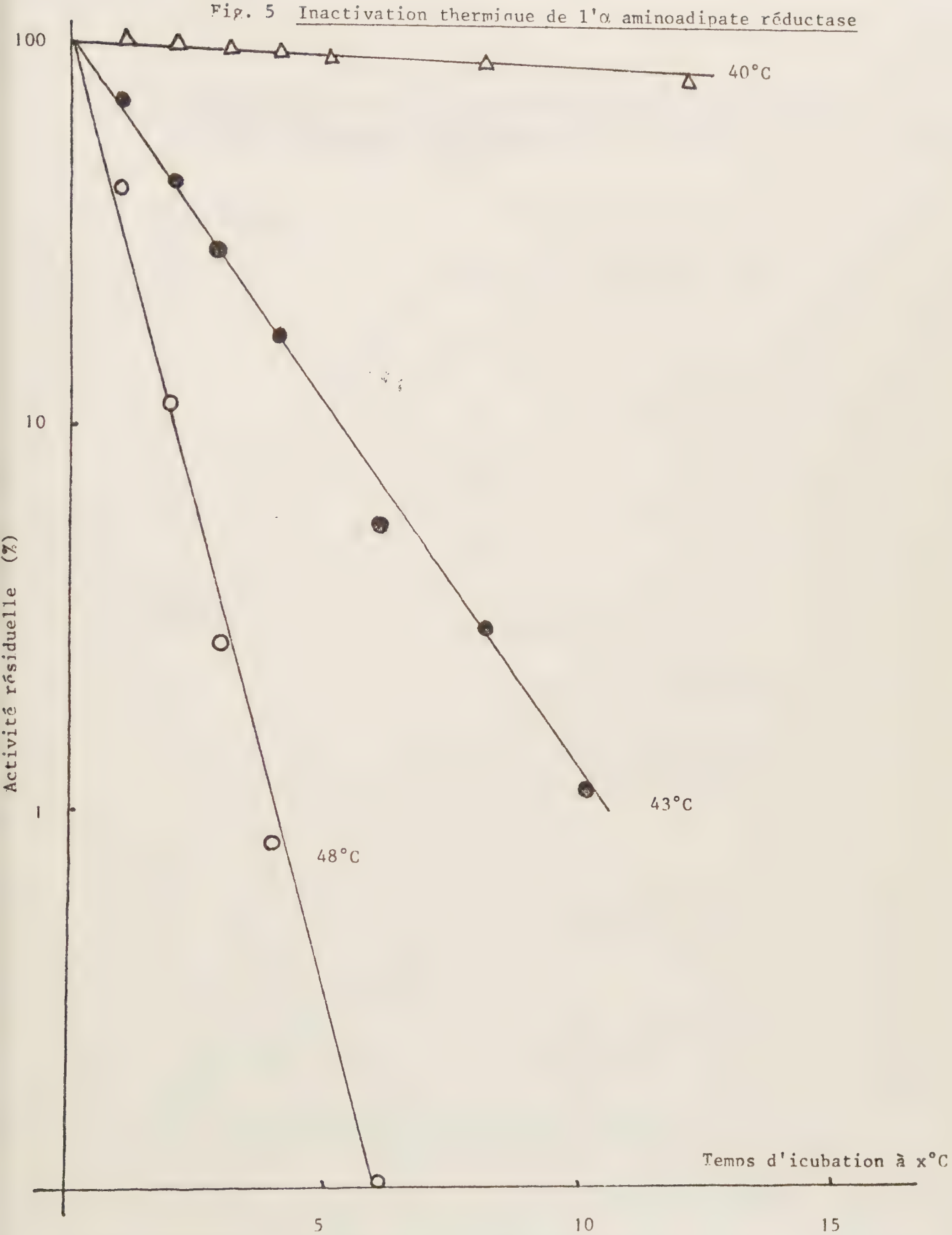
- Dosage de la série (1)+(2)+(3) (transformation globale)

Elle peut être réalisée en piégeant AASA par le para aminobenzaldéhyde (pDMABA) et en mesurant à 480 nm l'absorption du composé orange formé (Sagisaka et Shimura 1959). On ne peut pas définir des conditions de linéarité satisfaisantes (voir fig.6), peut-être parce qu'il y a inhibition du système par l'AMP libéré par la 1ère réaction (Sagisaka et Shimura 1960), mais l'addition d'un système régénérateur d'ATP n'améliore rien.

Le mélange réactionnel standard comprend : 200 µl d' αAA 0,05 M, 200 µl de tampon TRIS HCl pH 8,0, 50 µl de $MgCl_2$ 0,06 M, 100 µl de glutathion réduit (0,8 mg/cc), 100 µl d'ATP 0,06 M, 100 µl de $NADPH_2$ 0,01 M, 20 µl d'extrait et de l'eau qsp 1 ml. L'optimum de la réaction est proche de pH 8,0 en tampon TRIS, les résultats sont moins bons en tampon phosphate. Le mélange est incubé 6 min. à 25°C puis porté à 100°C pendant 10 min. après addition de 400 µl de pDMADA (2% dans le méthylcellosolve) et de 300 µl de tampon phosphate 0,5 M pH 6,0. Après refroidissement, on ajoute 1,3 ml d'éthanol à 60%, on centrifuge les protéines et la densité optique du surnageant est lue à 480 nm contre un blanc sans αAA

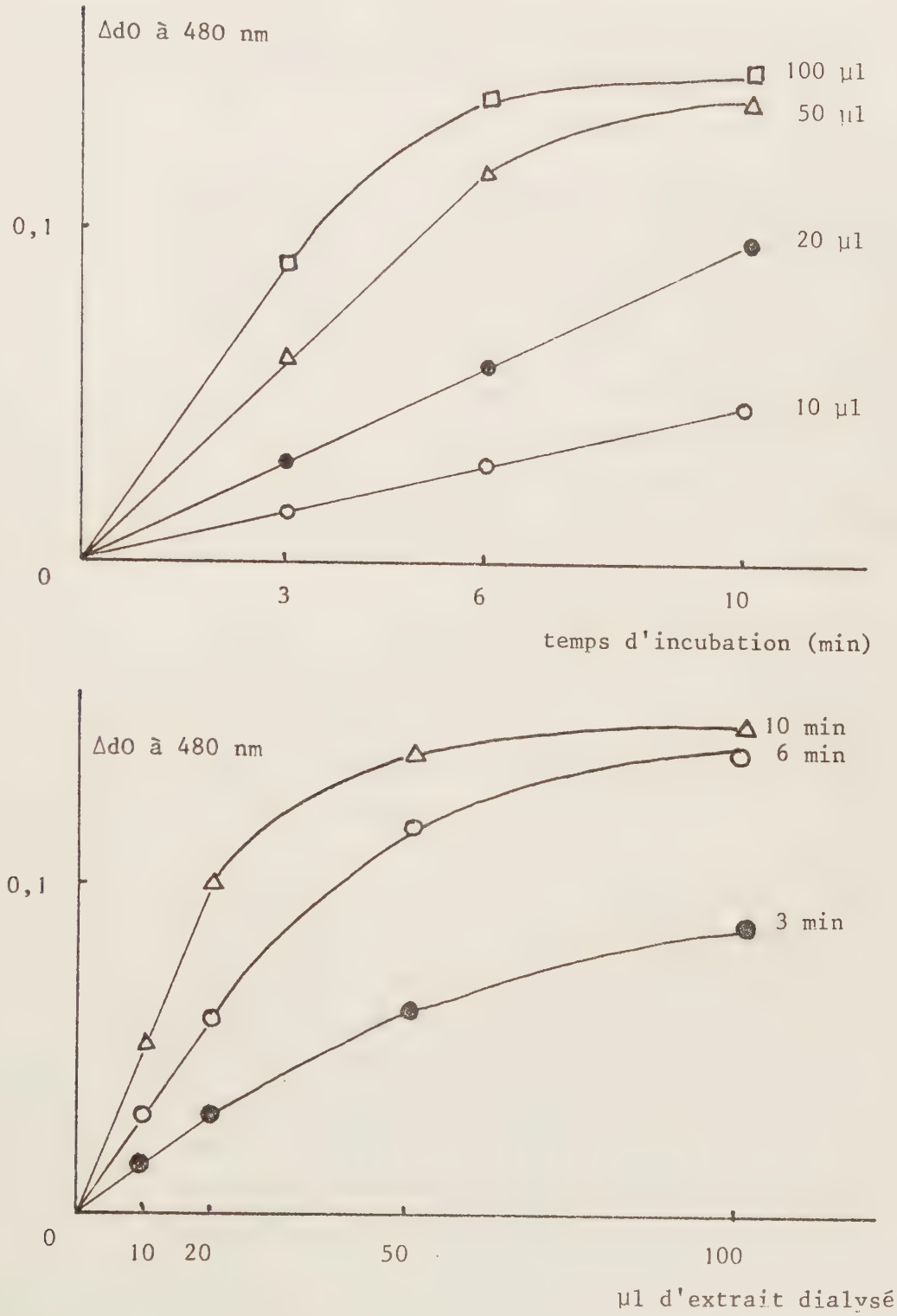
Cette méthode de dosage a surtout servi à rechercher des complémentations entre mutants in vitro. Les activités spécifiques obtenues sont très variables.

Fig. 5 Inactivation thermique de l'α aminoadipate réductase



L'extrait de la souche W 29 est incubé le temps indiqué dans le tampon d'extraction à 40°, 43° et 48°, puis ramené à 0°. Les protéines qui ont éventuellement précipité sont éliminées par centrifugation. Le dosage de l'activité résiduelle est fait dans les conditions décrites ($NADPH^2$)

Fig. 6 Linéarités du dosage de l'aminoadipate réductase par la méthode au pDMABA (formation du semi-aldéhyde).



Linéarités du dosage de l'aminoadipate réductase en fonction du temps d'incubation (en haut) et de la quantité d'extrait de la souche W 29 (en bas). On mesure à 480 nm l'apparition du produit de la réaction globale (1+2+3) par le pDMABA-voir texte-.

c) Dosage de l'aminoadipate semialdéhyde glutamate réductase (AASAGR) EC 1.5.1.9

Cet enzyme catalyse la condensation du glutamate sur l'AASA pour former la saccharopine suivant la réaction :

$$AASA + glutamate + NADPH_2 \rightleftarrows saccharopine + NADP^+ + H_2O$$

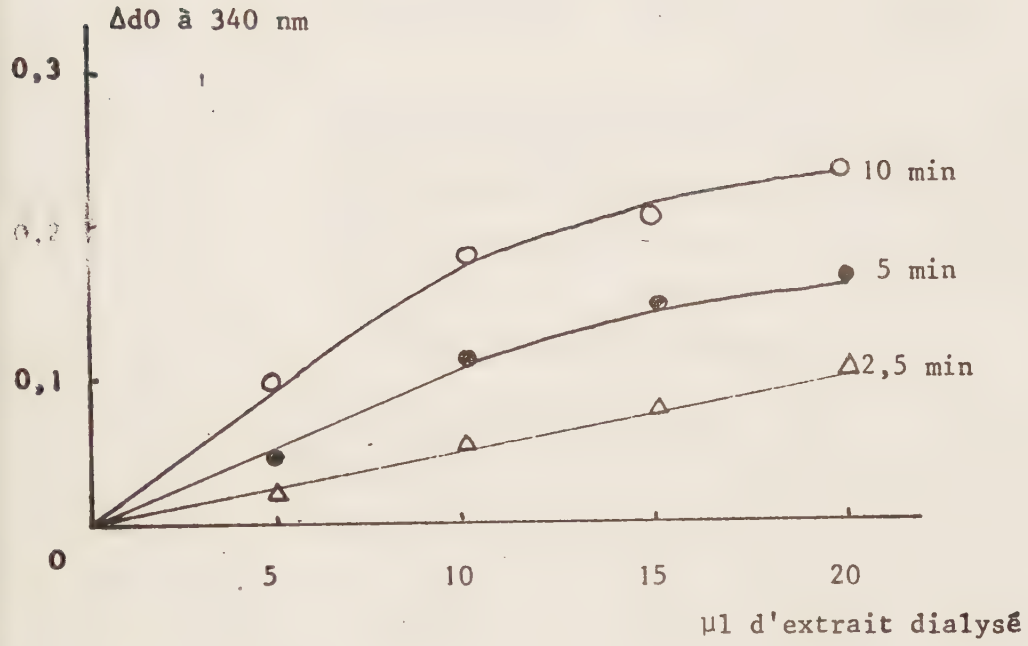
Comme nous ne disposions pas d'AASA, le dosage a toujours été effectué dans le sens réverse saccharopine → AASA. La réaction est alors mesurée dans les conditions suivantes tampon glycine NaOH 0,2 M pH 9,5 (400 µl), saccharopine 0,02 M (150 µl), NADP 0,02 M (50 µl), 10 µl d'extrait dialysé eau qsp 2 ml. On suit l'apparition du $NADPH_2$ à 340 nm à 25° contre un blanc sans saccharopine. Le NAD peut remplacer le NADP mais est moins efficace (10% d'activité en moins environ). On peut également mesurer la formation d'AASA par la méthode au pDMABA décrite ci-dessus.

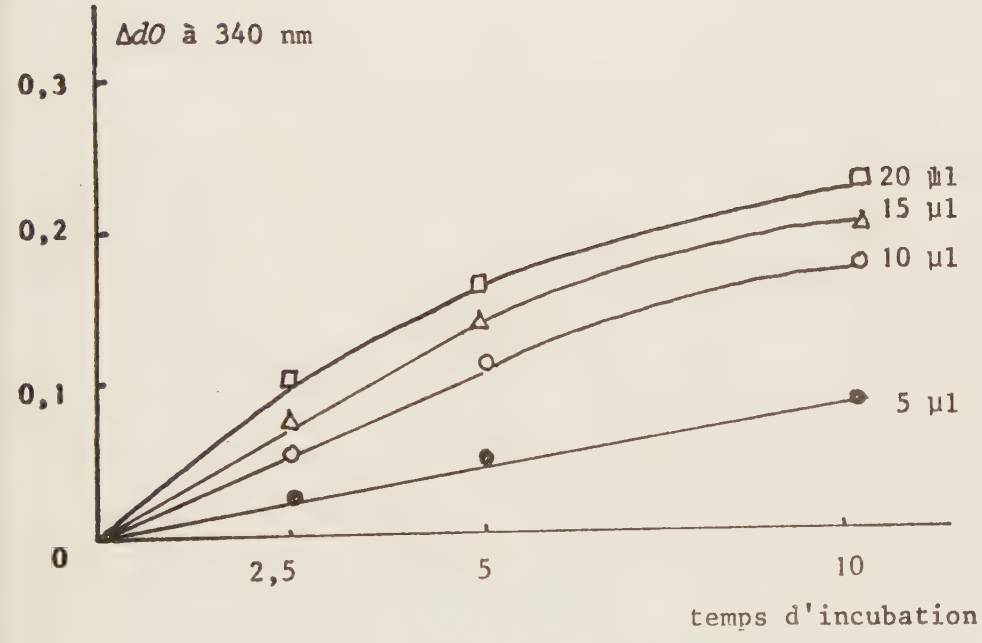
L'enzyme se conserve bien à 4°C pendant une semaine au moins dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 contenant du thioglycérol 1 mM et de l'EDTA 10^{-4} M. En l'absence d'EDTA, l'enzyme perd 20% d'activité en 2 jours, 52% en 5 jours.

L'optimum de pH se situe entre 9,5 et 10,0, on peut définir des conditions de linéarité satisfaisante (fig 7) sur un extrait dialysé 4 H. contre le tampon d'extraction ci-dessus Dans le tampon 2 décrit pour l'extraction simultanée des activités AAR, AASAGR et SDH, l'activité en fonction du temp n'est linéaire que pendant moins d'une min. Dans les conditions retenues, les demi-vitesses maximum sont atteintes pour $S_{0,5}$ NADP 0,04 mM et $S_{0,5}$ saccharopine 0,6 mM. La réaction est complètement inhibée par 1 mM pCMB.

../..

Fig.7 Linéarités du dosage de l'aminoadipate-semialdéhyde-glutamate-réductase (AASAGR) -souche W 29.





Linéarités du dosage de l'AASAGR en fonction du temps d'incubation (en bas) et de la quantité d'extrait de la souche sauvage (en haut). Pour les conditions de dosage, voir texte.

d) Dosage de la saccharopine déshydrogénase (SDH) EC 1.5.1.7.

Cet enzyme catalyse la conversion de la saccharopine en lysine en présence de NAD suivant le schéma.

$$\text{saccharopine} + NAD + H_2O \underset{2}{\overset{1}{\rightleftarrows}} \text{lysine} + \alpha \text{ cétoglutarate} + NADH_2$$

Certains auteurs ont proposé que la transamination particulière catalysée par l'AASAGR et la SDH fasse intervenir des bases de Schiff intermédiaires (Saunders et Broquist 1966); ce problème n'a pas été abordé.

- Dosage dans le sens aller

L'enzyme est extrait dans le tampon n° 2. Le milieu réactionnel comprend : tampon glycine NaOH 0,2 M pH 9,75 (400 µl), saccharopine 0,025 M (400 µl), NAD 0,03 M (200 µl) et 10 µl d'extrait dans eau qsp 2 ml. La réaction est suivie à 340 nm (réduction du NAD) contre un blanc sans saccharopine.

Il est impossible de mesurer cette transformation sur un extrait brut de la souche sauvage à cause de l'existence d'une activité AASAGR (voir Remarques §.f). La difficulté peut être tournée par fractionnement de l'extrait sur sulfate d'ammonium (voir tableau 4) à pH 7,0.On suit l'activité SDH dans le sens 2 en cours de fractionnement. On perd environ 40% de l'activité totale. La séparation n'est cependant pas totale dans ces conditions. La totalité des expériences cinétiques résumées ci-dessous a été conduite avec un mutant dépourvu d'activité AASAGR : lys9. L'optimum de pH de la réaction est au-delà de pH 10,0.

On mesure alors des K_m apparents de l'ordre de 0,8 mM pour le NAD et de 0,6 mM pour la saccharopine. Le NADP ne remplace pas le NAD (moins de 1% de l'activité).

../..

L'activité SDH est sensible au pCMB (inhibition totale à 0,6 mM), elle est inhibée non compétitivement par la lysine et incompétitivement par l'α cétoglutarate quel que soit le substrat variable (saccharopine ou NAD). L'inhibition par le NADH est compétitive si le NAD est le substrat variable, non compétitive si c'est la saccharopine. Ces résultats ainsi que ceux qui seront présentés ci-dessous indiquent que la réaction obéit à un mécanisme ordonné du type de celui qui est rencontré chez la plupart des déshydrogénases à nucléotide pyridinique : le coenzyme se fixe en premier et est libéré en dernier. La même constatation a été faite sur la saccharopine déshydrogénase de *S. cerevisiae* (Fujioka et Nakatani 1970)

L'enzyme est par ailleurs très sensible à l'ammonium : il est indispensable de dialyser les extraits pour éliminer la lysine et les ions ammonium (voir fig.8)

Tableau 4 - Séparation des activités AAR, AASAGR et SDH

Traitement	AAR (1+2)		AASAGR		SDH	
	AS	AT	AS	AT	AS	AT
Extrait dialysé	11,2	100	16,2	100	360	100
5% $MnCl_2$ 1 M	13,3	105	18,3	55	397	110
0-40% $(NH_4)_2SO_4$	0,9	3	0,5	1	45	3
40-55% $(NH_4)_2SO_4$	28,0	52	2,9	4	664	46
Surnageant	0	0	38,2	48	218	15

AS : Activités spécifiques en nmoles de coenzyme formé.

AT : Pourcentage d'activité totale.

../..

Fig.8 Inhibition de l'activité saccharopine deshydrogénase (sens lysine → saccharopine) par la lysine (○) et les ions ammonium (●).

Extrait dialysé de la souche mutante lys9. Conditions de dosage décrites dans le texte.

- Dosage dans le sens retour

Les conditions de dosage standard retenues sont les suivantes : tampon phosphate de potassium pH 7,0 0,5 M (500 µl), lysine 0,2 M (100 µl), α cétoglutarate (neutralisé par KOH) 0,1 M (50 µl), NADH 2,5 mM (300 µl) 10 µl d'extrait brut dilué 20 fois dans le tampon d'extraction (volume final 2 ml). On suit la disparition du NADH à 340 nm, à 25° contre un blanc sans α KG. Les conditions de linéarité sont très bonnes.

L'optimum de pH de la réaction est voisin de 7,0. Les K_m apparents mesurés en faisant varier l'un des substrats à saturation des deux autres, sont de 1,45 mM pour la lysine, 0,65 mM pour l'α cétoglutarate et 0,11 mM pour le NADH. Le NADPH remplace très partiellement le NADH (10% d'activité environ). Les constantes de Michaelis pour le NADH sont indépendantes des concentrations en α cétoglutarate et en lysine, indiquant que ce substrat se fixe en premier. Par contre les constantes de Michaelis de l'α cétoglutarate sont indépendantes des concentrations en lysine, mais varient selon la concentration de NADH, tandis que les $S_{0,5}$ de la lysine sont affectées par la concentration de NADH et par celle de l'α cétoglutarate. Ces résultats confirment l'existence d'un mécanisme ordonné et permettent de postuler que dans ce sens, les substrats se fixent dans l'ordre NADH, α cétoglutarate et lysine.

La spécificité de la réaction est très grande : on n'observe aucune activité en remplaçant la lysine par la N ε acetyllysine, l'arginine, l'ornithine, la leucine ou l'isoleucine, ou l'α cétoglutarate par l'α cétoadipate ou l'oxaloacétate. On observe par contre une inhibition de la réaction par les acides aminés : celle-ci est cependant relativement moins importante

../..

que chez *S. cerevisiae* (80% d'inhibition par 2 mM leucine) de sorte qu'on pourrait utiliser cette réaction pour doser la lysine dans des milieux complexes (voir ci-dessous chapitre V. A.) - voir tableau 5.

Tableau 5 - Inhibition de l'activité SDH par les acides aminés (sens 2)

Acide aminé 10^{-2} M	% inhibition
Leu	53
Ileu	10
Orn	24
Arg	0
Norleu	41
N-ε-acetyllysine	5
α aminoadipate	0
Glu	0

L'activité de l'enzyme est à peu près constante en phase exponentielle, mais décroit rapidement en phase stationnaire (voir 3ème partie).

e) Dosage des activités AAR, AASAGR et SDH sur un même extrait

On a été amené à doser fréquemment 2 ou 3 de ces activités sur plusieurs souches à la fois, il était alors utile de disposer d'une méthode permettant de limiter les extractions ; celles-ci sont faites dans le tampon n° 2 pour les raisons suivantes : les trois activités sont stables dans un tampon phosphate à pH 7,2; l'AASAGR est rapidement dénaturée en l'absence d'EDTA tandis que l'inhibition de l'AAR par l'EDTA est réversible par les ions Mn^{++}; le FPMS est utile à la conservation de la SDH et le glutathion stabilise l'AAR.

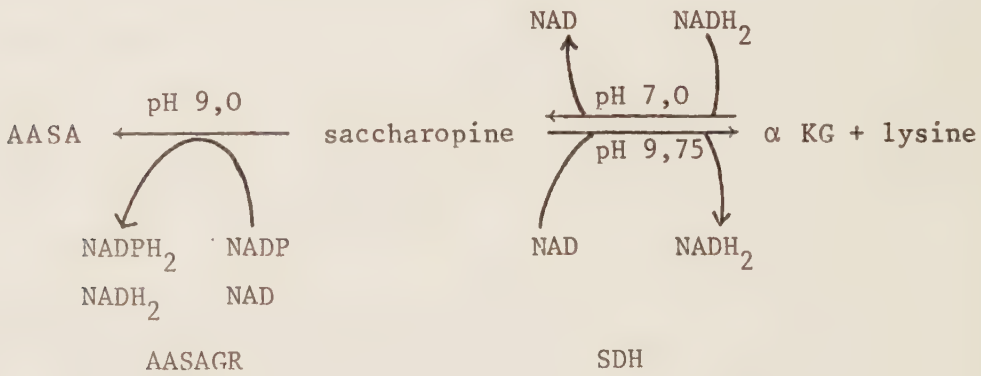
../..

La perte d'activité résultant de l'usage de ce tampon est de 0 pour la SDH, 5% pour l'AASAGR et 10% pour l'AAR.

f) Remarques sur les dosages des activités AAR, AASAGR et SDH

1) La mesure de ces activités a toujours été effectuée par lecture directe de la différence d'absorption entre une cuve contenant le mélange réactionnel complet et une cuve de référence; la valeur propre des témoins n'a pas été mesurée. Les témoins utilisés (absence d'un des substrats autre que les coenzymes : α AA, α KG, saccharopine) permettent de négliger l'interférence d'autres activités oxydoréductases à NAD (P) ou NAD (P)H_2. En utilisant des extraits dialysés, on évite les artefacts qui pourraient survenir si l'une des souches utilisées accumulait un des substrats de la réaction (témoins non "blancs").

2) On peut résumer les conditions de mesure des activités AASAGR et SDH sur le schéma suivant :



On voit que seule la mesure de l'activité SDH dans le sens lysine vers saccharopine est réalisable sans précaution particulière, car la réaction SDH aller et la réaction AASAGR (consommatrice des produits saccharopine et NAD) ne peuvent s'effectuer à pH 7,0. On peut par contre mesurer l'activité AASAGR en utilisant comme coenzyme le NADP qui est très mal utilisé par la SDH (1/100è de l'activité NAD), d'autant que

l'affinité de l'AASAGR pour le NAD/NADP est environ 20 fois plus élevée que celle de la SDH pour le NAD, alors que leur affinité pour la saccharopine est voisine. Par ailleurs, on peut mesurer directement la formation de l'AASA (piégeage par le pDMABA).

V. TECHNIQUES ANALYTIQUES

A. Dosage de la lysine

a) Extraction des "pools" d'acides aminés

La souche à tester est cultivée sur 100 ml de milieu liquide N5000 et récoltée en phase exponentielle à une densité cellulaire voisine de 7.10^7 cellules/ml (6 générations) : comme on le verra plus loin (3è partie) le "pool" intracellulaire de lysine ne varie pas beaucoup au cours de la croissance.

Les cellules sont lavées trois fois à l'eau distillée à 4°C et resuspendues à raison de 300 mg de cellules fraîches dans 5 ml d'eau. 2 ml de cette suspension sont filtrés sur filtre taré et serviront à estimer le poids sec. Le reste est incubé 10 min. au bain marie bouillant puis centrifugé. Le surnageant, filtré sur filtre Millipor constitue la fraction "pool".

b) Détermination de la lysine

Nous avons légèrement modifié la méthode de Shimura et Vogel (1966) afin de minimiser la contribution de l'arginine et de la proline. On ajoute successivement dans un tube à essai : 0,3 ml d'extrait à tester, 0,2 ml d'HCl 3N et 0,5 ml de ninhydrine (15% dans le méthyl-cellosolve p : v). On incube 1 H. en tube fermé à 100°C et on ajoute, après refroidissement, 1 ml d'acide phosphorique (H_3PO_4 concentré dilué au cinquième). La densité optique du produit rouge formé est lue à 450 nm contre un blanc sans extrait traité de même. Une gamme

../..

de lysine (5.10^{-5}M à 5.10^{-4}M) sert de référence. On a vérifié de façon répétée la spécificité de ce dosage en comparant les spectres des produits dosés dans l'extrait à celui de la lysine.

On a occasionnellement utilisé d'autres méthodes de dosage :

- Dosage microbiologique : la souche lys5 carencée 8 H. en lysine est supplémentée par différentes quantités de "pool", l'augmentation de densité optique après arrêt de la croissance est proportionnelle à la lysine apportée. La réponse est linéaire pour des concentrations variant entre 5.10^{-5} et $7,5.10^{-4}$M.

- Dosage enzymatique : on utilise l'activité SDH de W29 et on mesure les vitesses initiales sur un mélange réactionnel où la lysine est remplacée par de l'extrait. Avec une gamme de lysine connue, on déduit de la représentation de Lineweaver et Buck les concentrations de lysine inconnues. La méthode est très reproductible, mais peu sensible (5.10^{-4} à 5.10^{-3}M lysine), elle n'est pas utilisable si l'extrait contient de l'ammonium.

- Dosage sur analyseur d'acides aminés Technicon : on déduit la concentration inconnue de la surface du pic correspondant par comparaison à un échantillon de lysine connu. La norleucine sert de témoin. Cette méthode sert également à déterminer d'autres acides aminés que la lysine, mais elle est beaucoup plus lourde que les précédentes.

Les 4 méthodes donnent des résultats comparables; la première étant de loin la plus rapide, c'est elle que nous avons essentiellement utilisée. L'erreur expérimentale par la méthode à la ninhydrine ne dépasse pas 2% sur un échantillon donné, elle atteint 10% sur des échantillons identiques extraits séparément.

../..

c) Expression des concentrations de lysine

Il est maintenant bien établi que les "pools" intracellulaires de métabolites sont compartimentés chez les levures (Cowie et Mc.Clure 1959, Subramanian et al 1973, Wiemken et Durr 1974) rendant ainsi toute extrapolation des valeurs trouvées à une valeur physiologique plus qu'hasardeuse : nous n'avons pas cherché à exprimer des concentrations intracellulaires. Les résultats seront toujours exprimés en mM de lysine/g poids sec traité.

B. Système chromatographiques

On a utilisé pour la séparation des acides aminés les systèmes chromatographiques suivants :

- Système 1 : chloroforme, méthanol, ammoniaque 2:2:1 (gel de silice)
- Système 2 : phénol, eau 75:25 (gel de silice)
- Système 3 : butanol, acide acétique, eau 4:1:5 (gel de silice)
- Système 4 : alcool amylique, acide formique, eau 3:2:1 (cellulose)
- Système 5 : butanol, eau 7:3 (silice)

Les Rf des principaux composés testés sont donnés dans le tableau 6.

Tableau 6 - Rf de différents composés

	Systèmes chromatographiques				
	1	2	3	4	5
Lysine	0,30	0,06	0,08	0,82	0
N-ε-acetyllysine	0,78	0,50	0,25		
5-aminovalérate	0,50	0,30	0,42		
2-aminoadipate	0,57			0,72	0,57
pipécolate	0,60				
AMP				0,43	
adénine				0,80	
ATP				0,09	

../..

Les chromatogrammes sont révélés soit par aspersion de ninhydrine, soit par observation en UV (pour les nucléotides) ou enfin par autoradiographie; selon la méthode de Randerath (1970)

VI. MESURE DE L'ENTREE DE L'α AMINOADIPATE.

Nous nous sommes inspirés de la méthode mise au point par J.M. Beckerich (1975) pour étudier le transport de la lysine chez *S. lipolytica*.

On ensemence une préculture liquide sur MMN5000 tamponné à pH 3 par un tampon phtalate-HCl 0,1M avec une anse de la souche à tester, repiquée la veille sur YE solide. La préculture est agitée une nuit à 30°C, et sert à ensemencer à raison de 5.10^6 cellules/ml une culture sur le même milieu. Après 6 H., la culture atteint une densité d'environ 2.10^7 cellules/ml; les cellules ont effectué 7 à 8 générations sur le milieu décrit. Elles sont alors filtrées sur un filtre Whatman GF/B et réensemencées sur le même milieu préchauffé. On les laisse s'y équilibrer 10 min dans un erlen rempli au dixième et maintenu à 30°C.

La mesure du transport est effectuée de la façon suivante, à 30°C. On ajoute à 1ml de milieu préchauffé N5000 pH 3, contenant 1mM d'αAA froid et $\simeq 2.10^5$ cpm d'αAA 6-^{14}C, 1 ml de la suspension cellulaire. La réaction est arrêtée après 1 min par addition de 40 ml de Glu 10mM à 0°C (le glutamate est un inhibiteur compétitif du transport de l'αAA, qui a pour le transporteur étudié une plus forte affinité que l'αAA, voir 3e partie). On filtre le milieu réactionnel sur Whatman GF/B, et on lave les cellules par 40 ml d'eau distillée froide. Après séchage des filtres, on compte la radioactivité retenue dans un compteur à scintillation. On déduit des valeurs obtenues celle d'un témoin à l'azoture de sodium 1mM (concentration finale dans le test au temps zéro). L'activité de transport et d'accumulation est exprimée en nmoles d'αAA transportées par min par 10^7cellules ou par mg de poids sec (déterminés sur un aliquot de la suspension testée).

Deuxième Partie

CONSTITUTION D'UN OUTIL GENETIQUE

Depuis les travaux de Wickerham (1970), on sait que *S. lipolytica* est un ascomycète et qu'il existe probablement deux signes de compatibilité à l'état haploïde. L'existence d'un stade diploïde était supposée, la plupart des asques se formant sur des hyphes sans conjugaison apparente. Il fallait d'abord s'assurer de l'existence d'un stade diploïde et étudier sa stabilité.

Les premières études génétiques se révélaient cependant délicates, car plusieurs problèmes se posaient : difficulté d'obtention de diploïdes à partir d'haploïdes compatibles, rareté des asques formés dans des confrontations "en vrac", hétérogénéité du nombre (0 à 4) et de la taille des ascospores dans les asques, faible pourcentage de germination enfin de ces ascospores (de 0,1 à environ 10%) ce qui semblait exclure toute analyse de sporées.

Avant d'entreprendre l'étude de certains problèmes physiologiques, il fallait disposer au préalable d'un meilleur outil génétique. On a d'abord essayé de mettre au point une sélection des éventuels diploïdes existants en induisant des auxotrophies complémentaires dans des haploïdes compatibles. Comme l'obtention de mutants auxotrophes semblait s'avérer délicate, nous avons été amenés, dans un premier temps, à tester différents agents mutagènes et à mettre au point une méthode de sélection. La plupart des mutants auxotrophes étudiés dans la 3ème partie ont été obtenus au cours de ces essais préliminaires. Dans un second temps, on a pu vérifier l'existence d'un stade diploïde stable et étudier les conditions de complémentation. Par croisements successifs des descendants de ces premiers diploïdes, on a enfin essayé d'obtenir des souches à peu près isogéniques et présentant des ségrégations régulières.

../..

I. ETUDE DES CONDITIONS D'OBTENTION DE MUTANTS

A. Choix d'un mutagène

Plusieurs mutagènes ont été essayés sur la souche W29 dans les conditions standard suivantes : les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle sur N5000 (phase stationnaire pour les mutagénèses aux rayons γ ou UV) sont lavées à l'eau distillée et amenées à une concentration déterminée. Après mutagénèse, elles sont lavées à l'eau physiologique, soniquées et étalées à différentes dilutions sur YE pour estimer la survie. Le reste de la suspension, conservé à 0°C, servira à des étalements ultérieurs. Le pourcentage d'auxotrophes est déterminé en étalant environ 5000 cellules viables sur YE (les colonies formées sont testées sur N5000 par réplique au pique fleurs) ou sur rouge de Magdala (les colonies roses sont auxotrophes, Horn et Wilkie, 1966). Les résultats d'une série d'expériences sont donnés dans le tableau 7.

Il semble que la NMG et les UV aient les meilleurs rendements, mais il faut souligner que la technique employée pour déterminer le pourcentage d'auxotrophes ne renseigne pas sur le nombre de mutants qu'on peut effectivement obtenir : beaucoup de clones sont impurs ou instables. Dans le tableau 8 on trouvera le nombre de mutants effectivement obtenus dans une expérience, c'est-à-dire ceux qui restent mutants après deux cycles de purification (stries sur YE, réplique sur N5000).

On constate qu'on perd environ 50% des mutants induits par les rayon γ ou le NMU : la plupart des "mutants" perdus le sont dès le premier repiquage et n'étaient sans doute que des artefacts de réplique. Un certain nombre de mutants induits par le NMU sont "leaky" (5 sur les 25 du tableau 8) et ont été considérés comme perdus. Avec ces réserves, on peut conclure que les mutants induits au NMU et aux rayons γ sont d'emblée stables.

../..

Tableau 7 - Induction de mutants dans la souche W29

Agent mutagène	Conditions de traitement	Survie %	% d'auxotrophes sur 5000 colonies sauf *
NMU	1 heure 10^{-3} (v:w)	$< 10^{-6}$	? *
	" 5.10^{-4}	$< 10^{-6}$	? *
	" 10^{-4}	$\simeq 10^{-4}$	< 1 *
	" 10^{-5}	0,01	0,8
	" 10^{-6}	30	$\simeq$ 0,1
NMG	20 min. 100 µg/ml	18	10
	" 200	1	20
	" 400	0,1	2
	" 1000	0,01	< 1 *
Rayons γ	25 KR	25	2
	50	9,5	3
	75	2	1,6
	100	1	0,5
	150	0,25	$\simeq$ 0,1
	200	0,01	? *
	250	$< 10^{-3}$	? *
Rayons UV	1000 ergs/mm2	50	0,2
	2000	10	10
	4000	0,05	1
	8000	$\simeq 10^{-6}$	< 0,1 *
	16000	$< 10^{-6}$	? *
HNO_2	1 heure 10^{-2}M	25	$\simeq$ 1
EMS	1 heure30, 1%	30	$\simeq$ 0,1

Quand on n'a pas obtenu de mutants, on l'a indiqué par un"?".

Tableau 8 - Mutants réellement isolés après mutagénèse

Mutagène et doser	Survie	Nbre de colonies testées	Nbre de mutants présumés	Nbre et % de mutants obtenus
NMU 10^{-5} v:w	0,01%	800	10	4 ≃0,5%
	0,07%	1423	15	7 ≃0,5%
UV 200 ergs	5%	4187	385	85 2%
	12%	2715	232	43 1,6%
NMG 200 µg/ml	3%	2995	750	72 2,4%
	0,8%	1752	427	38 2,2%
γ 25 KR	32%	3324	72	24 0,7%
50 KG	11%	2715	93	31 ≃ 1%

Les mutants induits par les UV et surtout la NMG sont remarquablement instables; bon nombre d'entre eux ont une croissance irrégulière pendant plusieurs repiquages, les mutants morphologiques sont nombreux. Bien que ces mutagènes soient un peu plus efficaces que le NMU ou les rayons γ leur utilisation est cependant compliquée par le fait que 10 à 20% des mutants repérés pourront effectivement être utilisés.

Il fallait par ailleurs s'assurer de la multiplicité des cibles touchées et de la simplicité des besoins nutritionnels, indications de l'obtention d'un large éventail de marqueurs et de la (relative) simplicité de leur déterminisme. Dans le tableau 9, on constate que le nombre de mutants non déterminés est très élevé dans le cas de la NMG : s'il est représentatif de mutations à déterminisme complexe (plus d'un besoin), cela signifie que les mutations induites par les UV ou le NMU seront plus faciles à étudier.

../..

Tableau 9 - Type de mutants compensables obtenus

Agent mutagène	poussent sur MM cas.												MM nuc ura ade cyt		MM vit
	arg	lys	leu	phe	trp	pro	met	cys	his	ileu	thr	?			
UV :2000 ergs/mm2	36	21	2	1	3	2	15	4	3	3	0	5/113	10	6	2
NMG:200 µg/ml	8	1	2	0	1	0	3	0	0	0	2	11/33	4	1	0
NMU:10^{-5} (v:w)	12	4	1	2	0	0	3	2	1	0	1	0/30	1	3	0

Certains types de mutants n'ont pas été obtenus, sans doute à cause de la faiblesse des effectifs testés, mais on constate dans tous les cas une nette prépondérance de mutants arg^- et dans une moindre mesure des mutants ura^-, met^- et lys^-. Ce phénomène dépend vraisemblablement de la souche utilisée : Bassel et al (1973) ont obtenu après mutagénèse aux UV une majorité de mutants ade^-, ura^- et met^-.

Dans ces conditions, on a retenu le NMU et les UV comme agents mutagènes; il faut noter cependant qu'aux doses utilisées, la survie est faible : ceci peut présenter un grave inconvénien pour l'étude génétique ultérieure de ces mutants (nombreuses modifications annexes).

B. Choix d'une méthode d'enrichissement

On peut avoir intérêt, dans certains cas, à disposer de mutants les plus "simples" possibles, c'est-à-dire différant par un seul caractère si possible de la souche de départ (éviter les back-cross). Il est évident que ces mutants ne pourront être obtenus dans les conditions de mutagénèse décrites ci-dessus, on a donc intérêt à rechercher des mutants spontanés. Pour faciliter ce travail éventuel, on a cherché à mettre au point une méthode d'enrichissement.

Différents inhibiteurs de la croissance des levures ont été utilisés pour enrichir une préparation en mutants :

../..

2-désoxyglucose chez *Schizosaccharomyces pombe* (Megnet 1965) ou nystatine chez *Saccharomyces cerevisiae* (Moat el al 1959). Nous n'avons pas trouvé chez *S. lipolytica* des conditions dans lesquelles le 2-déoxyglucose soit toxique pour une souche en croissance sans affecter la survie d'une souche stationnaire.

Plusieurs expériences préliminaires avec la nystatine, sur la souche W29 et un mutant met$^-$, nous ont permis de déterminer une dose et un temps de traitement qui induisent une létalité maximum dans la souche W29 sans affecter la survie des mutants met$^-$ (souches cultivées en N5000 non supplémenté). L'expérience de reconstitution présentée dans la fig.9 montre que, dans les conditions retenues, un facteur d'enrichissement voisin de 100 est obtenu. Il pourrait être amélioré par plusieurs cycles de nystatine successifs. La carence en azote pratiquée après la phase d'expression et avant passage sur milieu sélectif sert surtout à éviter une croissance résiduelle des mutants en présence de nystatine : ils seraient alors tués (voir tableau 10). Elle peut être remplacée par une carence en carbone (sélection des mutants lyc$^-$) ou supprimée si les cellules sont prises en phase stationnaire sur YE et lavées.

Tableau 10 - Influence de la carence azotée sur la récupération des mutants

Culture YE ensemencée avec 5 mutants met$^-$ pour 1000 cellules W29 (temps de génération identique sur YE).

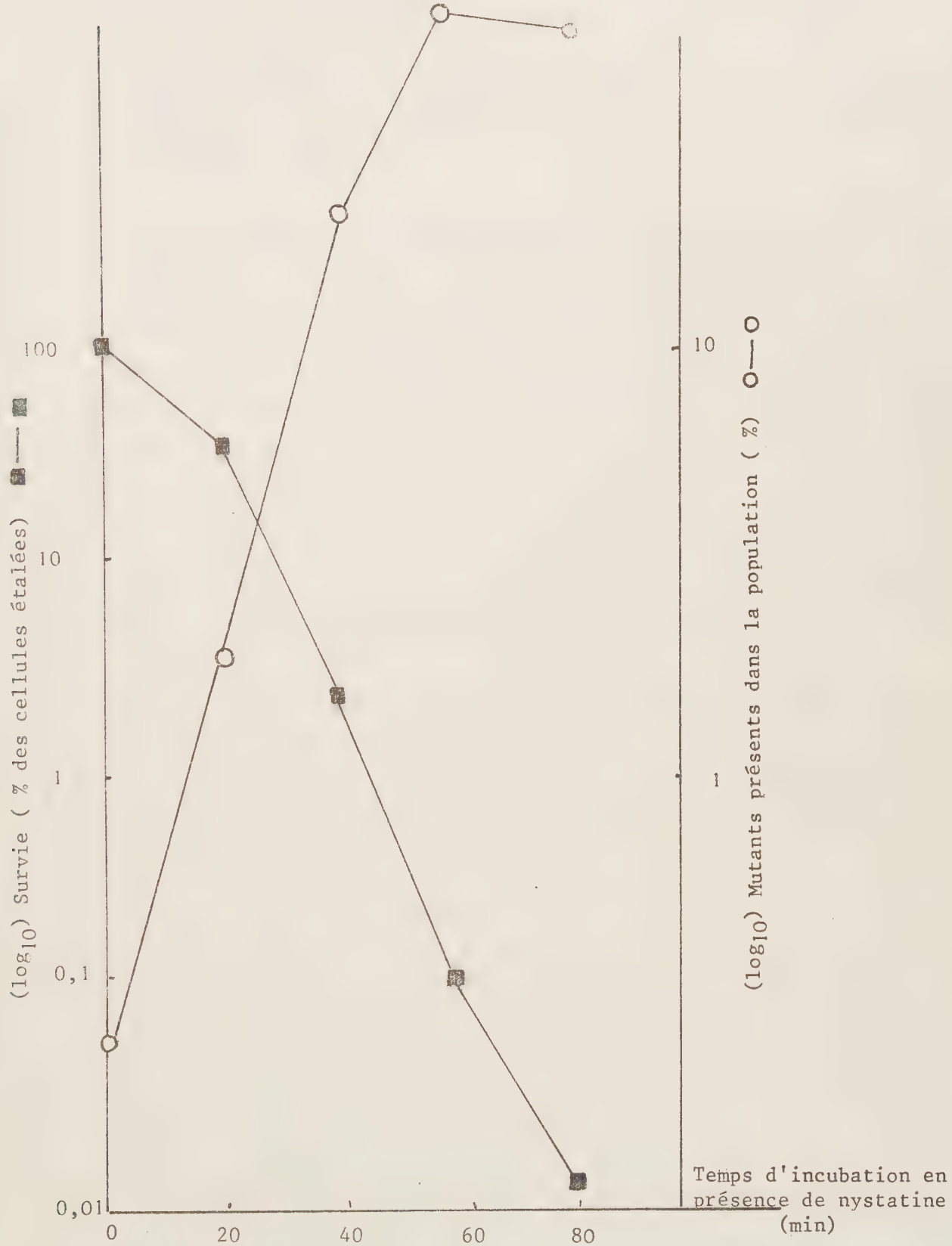
Conditions	Cellules viables/ml (étalement sur YE)	Auxotrophes attendus si pas tués /prototrophes	Auxotrophes présents dans la population
Fin de culture sur YE	10^7	5/1000	4 s/ 1200 colonies
A (avant nystatine	$2{,}5.\ 10^7$	~ 2/1000	
A (après nystatine	$1{,}7.\ 10^3$	20/2	2 s/ 1320 colonies
B (après N_o	$2{,}1.\ 10^7$	5/1000	
B (avant nystatine	$5{,}0.\ 10^7$	~ 2/1000	
B (après nystatine	$4{,}2.\ 10^3$	10/5	892 s/1015 colonies

A : La culture est centrifugée, lavée et ensemencée sur N5000. Après un doublement, on ajoute 10 µg/ml de nystatine et on incube 1 H.30

B : La culture est centrifugée, lavée et ensemencée 8 H.sur N_o, puis supplémentée en ammonium 5 g/l. Après le premier doublement, elles sont traitées comme A.

../..

Fig.9 Enrichissement en mutants par la nystatine.



Une culture en phase exponentielle sur YE, contenant 2 mutants met$^-$ pour 1000 cellules W 29, est carencée pendant 8 H. sur N_o, puis supplémentée en ammonium 5 g/l et additionnée de nystatine 10 µg/ml après un doublement. La survie est mesurée par étalement sur YE, le pourcentage d'auxotrophes par réplique sur MMN5000.

II. CONDITIONS DE CROISEMENT

Dans ce chapitre, nous essaierons de préciser les conditions favorables à l'établissement, au maintien et à la sporulation d'une souche diploïde.

Ces points ont fait l'objet d'études approfondies chez d'autres levures (voir revue par Fowell 1969), mais il n'est pas toujours facile d'extrapoler de ces études une suite logique d'opérations. Plusieurs travaux portant sur l'optimisation des milieux de sporulation par exemple ont été effectués avec des croisements en vrac de deux haploïdes compatibles placés dans différentes conditions. Il est alors difficile de démêler ce qui est dû à une formation accrue de diploïdes (effet sur la conjugaison), à la possibilité qu'ont eue ces cellules diploïdes de se multiplie (effet sur la stabilité et la sélection d'un stade diploïde), de ce qui revient à un effet sur la sporulation proprement dite de cellules diploïdes quelle qu'en soit l'origine.

Chez *S. lipolytica*, la stabilité d'un stade diploïde restait à démontrer, alors que son existence était fortement suggérée par les observations de Wickerham et al. (1970). Nous avons donc cherché dans un premier temps à caractériser l'établissement d'un stade diploïde.

A. Etude de la conjugaison

Deux techniques sont a priori utilisables. La première consiste à suivre dans une confrontation donnée l'apparition de zygotes. Cette technique n'a de valeur que si l'on peut sûrement distinguer un zygote des autres formes cellulaires et si le zygote formé donne effectivement naissance à un stade diploïde (pas de dédicaryotisation ou de dégénérescence). La seconde est plus indirecte : on suit dans une confrontation entre auxotrophes complémentaires et compatibles l'apparition des clones prototrophes qui résultent d'une complémentation dans le diploïde. Cette technique n'est utilisable que si les souches ne réversent pas (nécessité de témoins) et si les

diploïdes formés ne sporulent pas immédiatement. Par ailleurs l'accroissement du nombre de prototrophes au cours du temps n'est plus forcément le résultat unique de nouvelles conjugaisons.

a) Choix d'une méthode

1.) Formation de zygotes dans une confrontation W29 x Z30

On avait observé que dans une confrontation de souches compatibles placées sur un milieu de sporulation (type V8 ou YM) un certain nombre de cellules présentaient une morphologie spéciale : cellules plus ou moins allongées à appendice latéral. Dans certains cas, deux cellules étaient réunies par un mince canal ressemblant à cet appendice : il y avait vraisemblablement formation de zygotes après un stage de différentiation préalable. On a donc essayé de suivre l'apparition de ces zygotes dans des confrontations W29 x Z30; on s'est placé en milieu liquide pour minimiser les variations de morphologie cellulaire.

Différents milieux ont été essayés : milieux "riches" type V8 ou MC (Mc Clary et al, 1959 : acétate 1%, glucose 0,1%, extrait de levure 0,25%, NaCl et $MgSO_4$ 0,01%) et milieux "pauvres" type N5000 ou F (Fowell 1952 : 0,4% acétate).

A partir d'une préculture des souches W29 et Z30 (une nuit sur PSM à 30°, lavage) on prépare dans l'eau physiologique une suspension contenant 5.10^6 cellules/ml de chaque parent. Cette suspension est agitée 4 H. à 28° puis répartie entre 8 tubes à essais (5 ml par tube) qui sont centrifugés. Le surnageant est jeté. On resuspend le contenu de 4 tubes dans chacun des milieux testé et la suspension est agitée à 27°C au bain marie (150 tpm

La seconde série de 4 tubes est conservée telle que à la température de la pièce ("collage"), pour tester l'importance d'une étape d'agglutination des cellules, puis traitée comme la première. Des prélèvements sont faits toutes les 4 heures et examinés au microscope. On évalue le nombre de "zygotes" correspondant à environ 5000 cellules végétatives. Les résultats d'une telle expérience sont représentés sur la fig.10. Le principe de cette expérience a été emprunté à Fowell (1969).

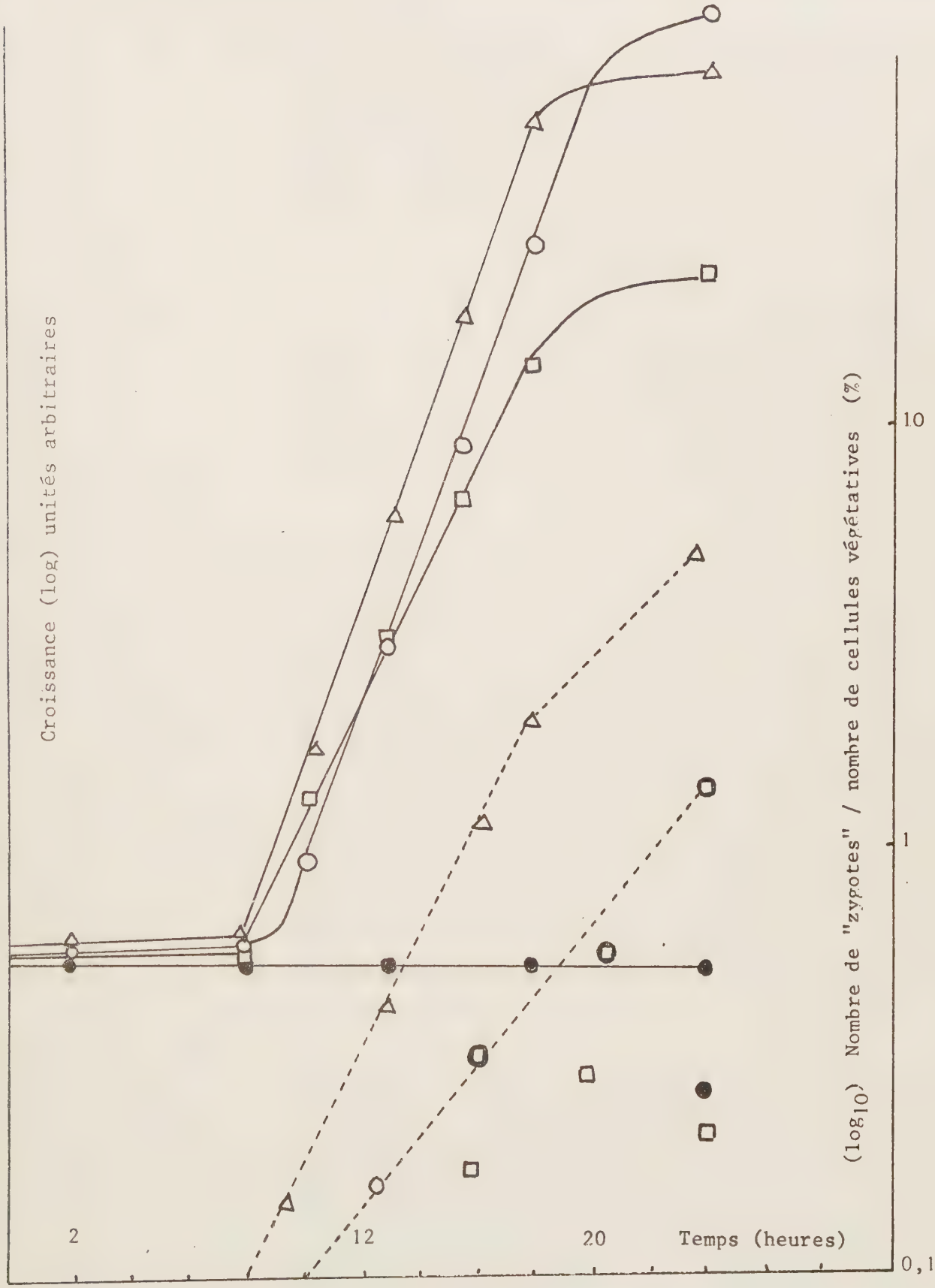
On constate que l'apparition de zygotes suit la croissan des cultures et que leur fréquence s'accroit tout au long de la phase exponentielle. L'efficacité des milieux dits "riches" semble très supérieure à celle des milieux minéraux, où seules quelques formes douteuses ont été observées. L'efficacité d'une étape de "collage" n'est pas très grande, peut-être parce qu'elle a été effectuée dans l'eau physiologique (si la conjugraison ne s'opère qu'entre cellules en croissance). Ces résultats ont été confirmés qualitativement sur des souches plus réactives que W29 et Z30 (Herman 1971).

Pour vérifier la nature des zygotes observés, on a essayé d'en isoler un certain nombre au micromanipulateur sur milieu MC. Mais sur 15 zygotes isolés, aucun ne forma de colonies : dans tous les cas, l'une des deux cellules mères émit un bourgeon; celui-ci se différencia en protoasque dans 8 cas. Il était possible soit que le stade diploïde fût très bref chez *S. lipolytica*, soit que les zygotes aient été endommagés, soit enfin qu'une bonne partie d'entre eux aient été létaux.

On a donc examiné au microscope une confrontation sur MC de W29 x Z30 après coloration vitale au bleu de méthylène: sur 317 zygotes examinés au cours de plusieur expériences, 264 semblaient partiellement létaux

../..

Fig.10 Apparition de "zygotes" dans une confrontation W29 x Z30



Les cellules de W29 et Z30 sont prises sur PSM, lavées et mélangées en quantités équivalentes. On ensemence différentes séries de milieux: △ V8, ○ MC, □ N5000, et ● F. La croissance est suivie au néphélomètre (courbes supérieures en traits pleins), et le nombre de "zygotes" présents parmi les cellules végétatives est déterminé au microscope.

La même expérience a été faite après une étape de "collage": les résultats sont identiques et n'ont pas été représentés.

(l'une des deux cellules mères se colorait intensément), soit 83%. Ou bien les "zygotes" observés ne représentaient que des formes anormales de bourgeonnement, ou bien une incompatibilité cytoplasmique faisait avorter la plupart des conjugaisons. Dans les deux cas, la méthode utilisée était inefficace.

Il faut noter que ce phénomène ne se rencontre pas chez toutes les souches sauvages de *S. lipolytica*; Herman (1971) n'a apparemment pas rencontré ces difficultés et les souches actuellement utilisées dans le laboratoire ne présentent plus ce phénomène, ou du moins pas toutes et sous une forme très atténuée.

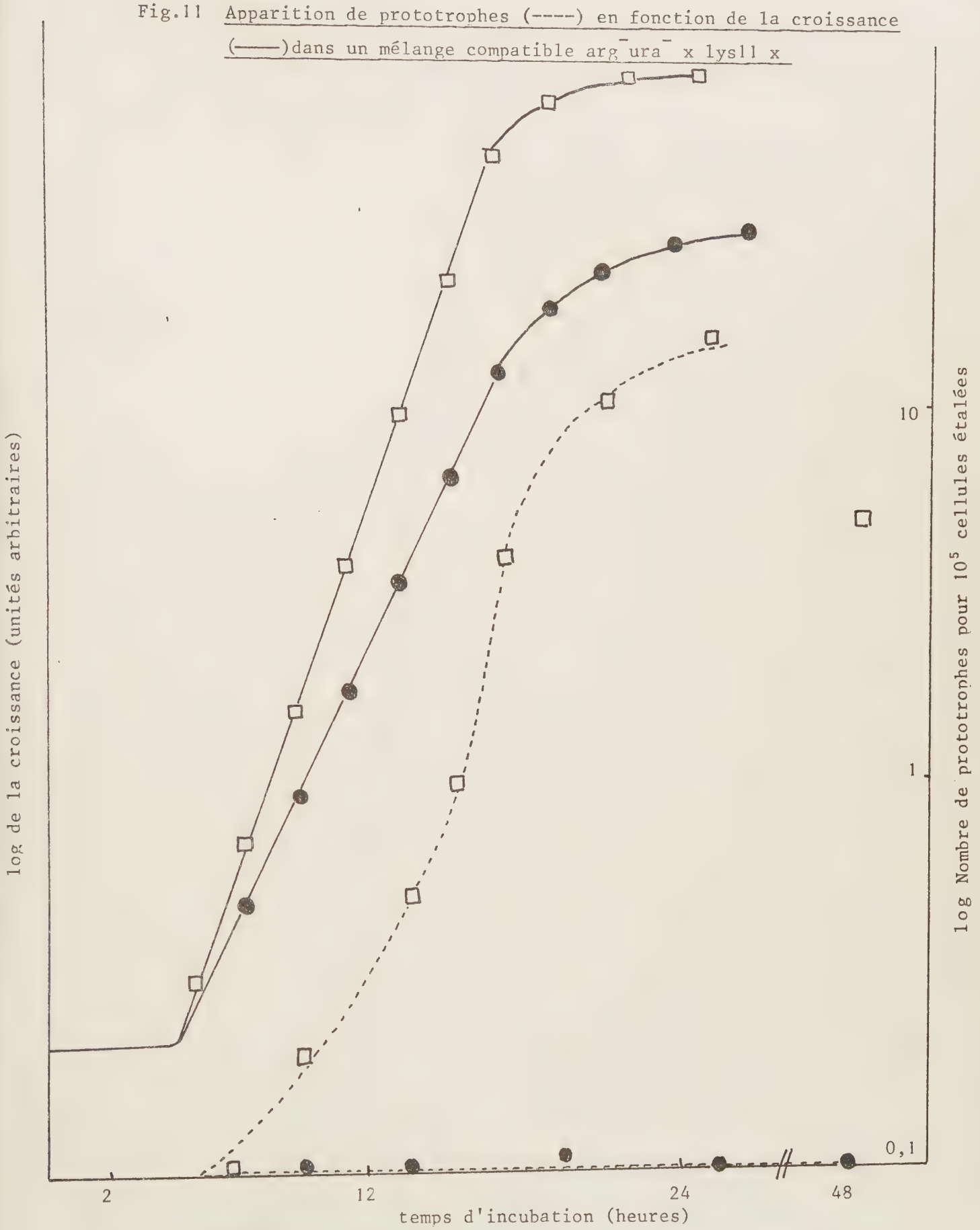
2.) Recherche de prototrophes dans une confrontation

Si un stade diploïde stable existe, et même si sa fréquence de formation est faible, on doit pouvoir le sélectionner par prototrophie. Pour minimiser le nombre de réversions parentales, on est parti des souches lys11 et arg1, dans lesquelles on a induit des mutations secondaires: les parents utilisés sont phénotypiquement arg⁻ ura⁻ et lys11 x, x représentant un besoin qui n'a pu être déterminé. Les souches prétraitées comme ci-dessus mais non "collées", sont incubées en N5000 et MC liquides. Les prélèvements sont étalés sur N5000 (à raison de 10^5 cellules réparties sur 10 boîtes), - voir fig.11 -.

Bien que la fréquence des prototrophes soit très inférieure à la fréquence des zygotes observés dans le croisement W29 x Z30 (facteur 100), les résultats sont qualitativement comparables: le nombre de prototrophes obtenus s'accroit pendant la phase de croissance sur milieu MC et reste nul sur N5000. Tout se passe donc, si "figures de conjugaison" et prototrophes résultent bien d'une diploïdisation, comme si

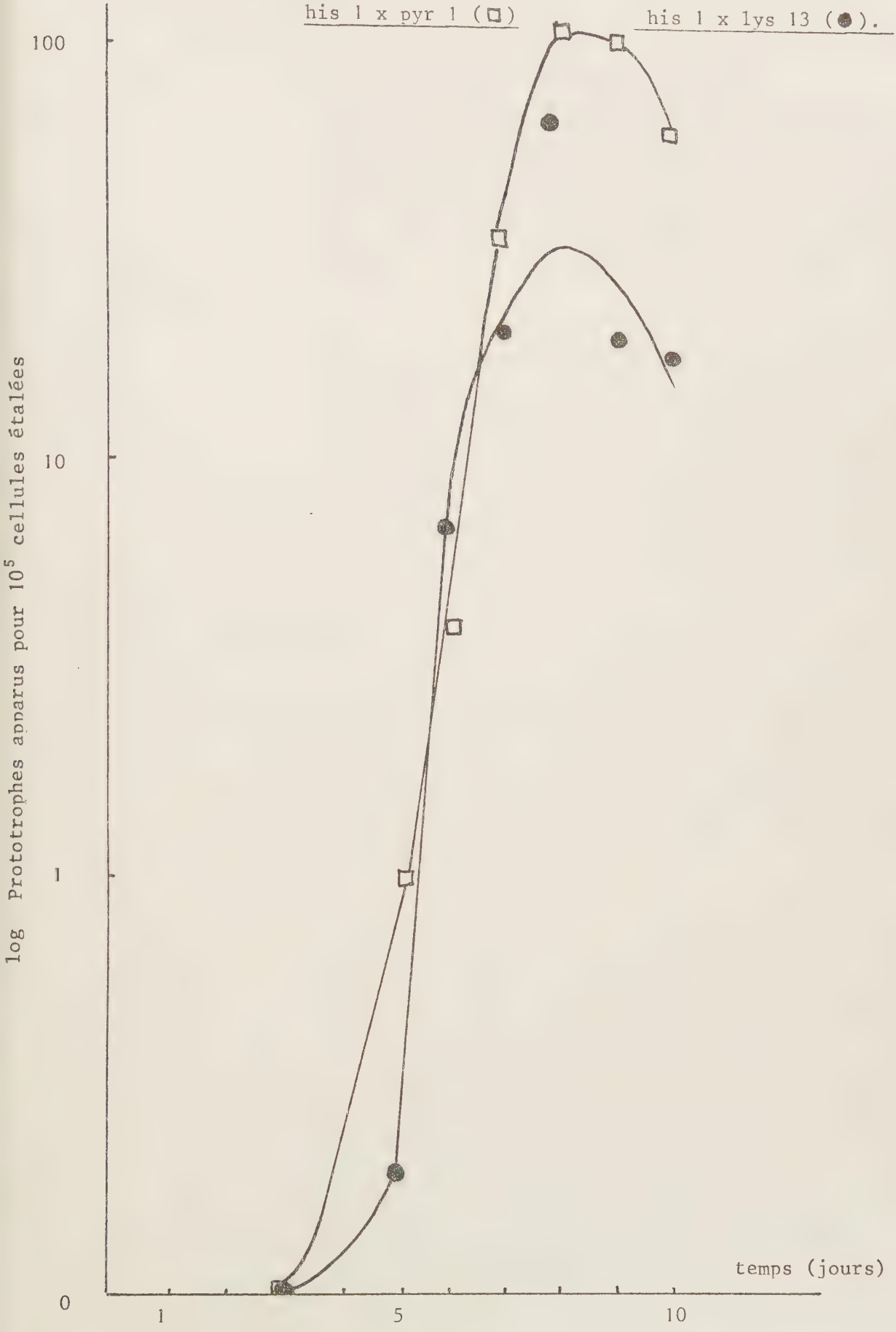
../..

Fig.11 Apparition de prototrophes (----) en fonction de la croissance (——)dans un mélange compatible arg⁻ ura⁻ x lys11 x



Les souches ont été précultivées une nuit sur PSM, mélangées à part égales et ensemencées sur milieu MC (□) et MMN5000 (●) liquides. Les suspensions sont incubées à 25°C et agitées doucement. Au temps indiqué, on mesure la turbidité de la culture et on étale une partie sur YE et N5000. On n'a pas fait de correction pour les réversions.

Fig.12 Apparition de prototrophes dans les confrontations his 1 x pyr 1 (□) his 1 x lys 13 (●).



Les auxotrophes ont été précultivés une nuit sur PSM, puis mélangés à part égales sur V8C et incubés à 25°C. Des échantillons sont prélevés au temps indiqué et étalés sur YE et MM. La fréquence de réversion d'un auxotrophe quelconque ne dépasse pas 2.10^{-6} dans ces conditions.

la conjugaison était un phénomène ayant les mêmes besoins énergétiques que la croissance et d'autres besoins à déterminer. L'existence d'un facteur de conjugaison n'a pu être précisée. On n'a pas trouvé d'effet stimulateur d'un filtrat de cultures sporulantes de *S. lipolytica* ou de *Schizosaccharomyces pombe*.

Des résultats identiques ont été trouvés avec d'autres croisements sur milieu V8C solide (his1 x pyr1, his1 x lys13) voir fig. 12. Dans tous les cas, la fréquence de formation des prototrophes est faible, de l'ordre de 10^{-3} au maximum, mais le maximum est atteint avant la fin de la croissance sur un milieu donné.

b) Vérification de la nature diploïde des souches obtenues

Plusieurs critères ont été utilisés pour établir la réalité de l'état diploïde. Le meilleur a été fourni par l'étude de la réapparition des marqueurs utilisés en combinaison parentale et recombinée. Nous rappellerons brièvement les autres observations.

1). Des mesures de taille cellulaire et de contenu en ADN, quoique grossières, semblent exclure la possibilité d'une sélection de révertants. Les tailles sont déterminées sur 250 à 300 cellules avec un micromètre objecti gradué au 1/100è de mm; les résultats rapportés dans le tableau 11 correspondent à la moyenne de 3 comptages effectués sur un croisement donné. Le contenu en ADN est déterminé par la méthode de Burton (1956) légèrement modifiée (voir tableau 12) : 5 clones prototrophes par croisement sont cultivés sur N5000 et examinés en phase exponentielle.

Tableau 11 - Tailles cellulaires de souches haploïdes et diploïdes

Toutes les cellules sont prises en phase exponentielle sur N5000 éventuellement supplémenté. Taille en nm

Souches	Longueur maximum	Longueur minimum
Z30	4,45	2,68
W29	4,32	2,81
his1	4,49	2,87
(his1/lys13)	7,58	4,13
(his1/pyr1)	7,82	4,08

Tableau 12 - Contenu en ADN de souches haploïdes et Diploïdes cultivées sur N5000

Souches	µg désoxyadénosine/ 10^8 cellules (1)
his1	0,68
lys13	0,61
Prototrophes his1 x lys13	1,38
	1,37
	1,33
	1,26
	1,31
Prototrophes his1 x pyr1	1,28
	1,36
	1,17
	1,28
	1,30
423-12	0,75
W29	0,72

(1) La culture lavée est soniquée et comptée. 5.10^8 cellules sont traitées 20 min.à 0°C avec 2 ml de TCA 10% et lavées 3 fois avec du TCA 5%. Le précipité est lavé à l'éthanol 20%, puis traité deux fois pendant 3 min. à 60° par un mélange éther alcool (3:1), et resuspendu dans 0,8 ml de TCA 5%. Il est alors incubé 20 min. au bain marie à 100° avec une gamme de désoxyadénosine dans le TCA 5%. On centrifuge et on ajoute 1 ml de réactif à la diphénylamine préparé juste avant à 0,5 ml du surnageant. La dO est lue à 595 nm après 17 H. d'incubation à 30°C.

2). Des observations cytologiques après coloration au Giemsa ne montrent pas l'existence de dicaryons, ni dans les cellules isolées, ni dans les hyphes.

3). L'état diploïde est stable : les premiers prototrophes obtenus ont été repiqués plusieurs fois sur YE (environ 60-70 générations), réétalés sur YE en colonies isolées et répliqués sur MM : aucun clone auxotrophe n'est apparu sur 2500 colonies environ. Le même résultat est obtenu en étalant un diploïde conservé 4 ans au réfrigérateur.

4). Les clones prototrophes forment des asques en abondance sur milieu de sporulation. On a constaté plusieurs fois au cours de ces expériences que les diploïdes isolés avaient, sur N5000 et YE, des temps de génération identiques à ceux des haploïdes de départ. Il n'y a pas d'avantage sélectif du diploïde dans les conditions de conjugaison.

c) Etude des conditions de milieu

La conjugaison chez *S. cerevisiae* et *Hansenula wingei* est favorisée par la présence du glucose et d'un certain nombre de vitamines (Fowell 1969). Dans le but de préciser certaines des observations précédentes, on a essayé de définir le rôle de divers composés sur la conjugaison de *S. lipolytica*.

Nous sommes partis pour cela d'un milieu de base MC (acétate 1%, glucose 0,1%, extrait de levure 0,25%, NaCl et $MgSO_4$ 0,01%) dont on a fait varier successivement la concentration de chacun des constituants : acétate, glucose, extrait de levure, etc... A chaque étape on est reparti du milieu de la série précédente qui avait donné les meilleurs résultat On a choisi ainsi le milieu MC1 parce qu'il donnait d'aussi bons résultats que le milieu MC de départ, et on a fait varier sa concentration en glucose : on retient le milieu MC13 (MC sans acétate contenant 1% de glucose) et ainsi de suite (voir tableau 13)

../..

Tableau 13 - Influence du milieu sur la formation de prototrophes dans la confrontation his1 x pyr1

Milieu de base	Milieux modifiés	Modifications par rapport au milieu de base		Nombre de prototrophes pour 10^5 cellules étalées sur N5000
MC				≃ 90
MC	MC1	acétate	0	87
	2	acétate	0,1%	95
	3	acétate	0,5%	83
	4	acétate	1%	89
	5	acétate	5%	82
MC1	MC11	glucose	0,1%	77
	12	glucose	0,5%	159
	13	glucose	1%	195
	14	glucose	5%	211
	15	glucose	0	3 *
MC13	MC21	ext. levure	0,1%	187
	22	ext. levure	0,3%	211
	23	ext. levure	0,5%	217
	24	ext. levure	1%	192
	25	ext. levure	0,01%	118
MC22	MC31	NaCl	0	186
	32	NaCl	0,005%	195
	33	NaCl	0,01%	189
	34	NaCl	0,05%	115
	35	NaCl	0,1%	62
MC31	MC41	KCl	0	216
	42	KCl	0,005%	208
	43	KCl	0,01%	216
MC41	MC44	$MgSO_4$	0	219
	45	$MgSO_4$	0,01%	208
MC44	MC51	Malt	0	137
	52	Malt	0,15%	155
	53	Malt	0,30%	216
	54	Malt	0,60%	225
	55	Malt	1,2%	209
MC53	MC61	Peptone	0	316
	62	Peptone	0,1%	325
	63	Peptone	0,5%	432
	64	Peptone	1%	412
MC63	MC71	0		516
	72	- ext. levure		12 *
	73	- malt		483

../..

../...

MC63	MC74	-peptones	526
	75	-ext. levure,-malt	7 *
	76	-ext. levure,-pepetones	1 *
	77	-malt,-peptones	233
	78	MC76 + $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l	8 *
	79	-glucose	17 *

* Dans aucune expérience, le nombre de réversions d'une souche observée dans les mêmes conditions n'a dépassé 10 pour 10^6 cellules étalées. Il n'est cependant pas possible, dans les cas marqués *, de distinguer réversions et complémentations.

Pour tester l'influence de ces modifications sur la conjugaison, le protocole retenu est le suivant : on dépose 0,5 ml d'une suspension contenant entre 5.10^6 et 10^7 cellules de chaque parent (provenant d'un repiquage de la veille sur YE) au centre d'une boîte de Pétri (diamètre 5 cm) contenant 10 ml du milieu à tester. Après 3 jours à 25°, la plage est resuspendue dans l'eau distillée, soniquée, puis étalée sur 10 boîtes de N5000 à raison de 10^4 cellules par boîte (les hyphes sont détruits). Les résultats sont rapportés dans le tableau 13 pour une confrontation his1 x pyr1.

On trouve un effet prononcé de l'extrait de levure (comparer MC71 et MC72) qui peut avoir trois explications :
1. l'extrait de levure peut servir de source d'azote : il est pourtant impossible de remplacer l'extrait par de l'ammonium inorganique (MC78) et les peptones aux doses utilisées (5 g/l) servent largement de source d'azote. La quantité d'extrait de levure nécessaire en l'absence de peptones est par ailleurs très faible (voir MC25). On retrouve là un résultat déjà décrit chez *H. wingei* (Brock 1961), à savoir qu'aucune source d'azote extérieure n'est nécessaire pour la conjugaison. 2. l'extrait de levure peut apporter des acide aminés. Ceci semble également peut probable puisque les peptones ne peuvent le remplacer. 3. l'extrait de levure

peut apporter des vitamines. Cette hypothèse pourrait être testée en essayant différentes combinaisons de vitamines. On aurait là une situation assez proche de *S. cerevisiae* (Iguti et Ônubu 1964) et différente de *H. wingei* (Crandall et Brock 1968) où seule une source de carbone est nécessaire. Un extrait de *S. lipolytica* n'est pas plus efficace que l'extrait commercial (Difco).

Bien que l'effet d'une soustraction du malt seul ou des peptones seules du milieu MC 63 ne soit apparemment pas très important (voir MC73 et MC74),la soustraction des deux (MC77) réduit l'efficacité de moitié. Il faut supposer qu'ils apportent un ensemble de constituants communs qui sont activateurs de la conjugaison (acides aminés ?). On a vérifié au cours d'expériences complémentaires, qu'un milieu type MC25 supplémenté en hydrolysat de caséine 5% (Casaminoacids Difco) était à peu près aussi efficace que MC71 .

L'importance d'une source de carbone est illustrée par le milieu MC15. Le glucose semble plus efficace que l'acétate (comparer MC5 0,1% glucose + 5% acétate et MC14 5% glucose). Il faut noter à ce propos que chez *S. lipolytica* on n'a pas trouvé d'effet prononcé d'une préculture liquide agitée des parents sur la conjugaison, de sorte qu'un effet positif de la respiration sur la conjugaison n'a pas été mis en évidence (voir au contraire Jakob 1962 et Brock 1961). Il est vraisemblable que la supériorité du glucose ne reflète qu'un effet général sur le métabolisme, l'acétate étant assez mal utilisé par *S. lipolytica*.

Comme le montre enfin la série de milieux MC3 et MC4, il n'y a aucun effet stimulateur des cations monovalents ou du magnésium utilisé pour favoriser l'agglutination des cellules chez *Hansenula wingei* (Brock 1961). Ce dernier résultat va dans le même sens que l'absence d'un effet de collage prononcé.

../..

En conclusion, il semble qu'un milieu de type MC63, identique au milieu YM défini par Wickerham (1951) soit approprié à l'obtention de diploïdes.

Il faut noter que ces résultats ne sont que partiellement en accord avec ceux que rapporte Herman (1971) sur d'autres souches de *S. lipolytica*. Si cet auteur décrit bien comme milieu optimal un milieu solide RG contenant de l'extrait de levure, des peptones et du glucose, les concentrations décrites sont toutes environ 10 fois plus faibles et selon cet auteur, de mauvaises conditions physiologiques favorisent la conjugaison. On a trouvé plusieurs fois cependant que le milieu YM était très supérieur au milieu RG pour l'isolement de diploïdes par prototrophie, probablement pour deux raisons: en permettant une bonne croissance végétative des parents il augmente les chances de conjugaison,et en retardant la sporulation (effet probable du glucose) il réduit les chances de sélectionner les spores recombinées (d'après Herman, un zygote formé sur RG sporule dans les heures qui suivent sa formation). Il est cependant possible que le milieu RG soit plus favorable à l'isolement de zygotes au micromanipulateur.

.) Autres paramètres affectant la conjugaison

Contrairement à ce qui se passe chez *S. cerevisiae*, la conjugaison est très affectée par les températures élevées: la fréquence des prototrophes obtenus dans une confrontation est réduite par un facteur 100 environ quand la température d'incubation sur YM passe de 20°C à 33°C. Une température comprise entre 20° et 25°C semble optimale.

L'âge des cultures mises sur YM n'a théoriquement que peu d'importance, sauf si l'une des souches présente un temps de latence important: dans ce cas la conjugaison est peut être défavorisée par un déséquilibre du nombre de parents en présence (voir ci-dessous). Un cas très net est fourni par

../..

les souches porteuses du marqueur (col 1.): celles-ci forment rapidement des colonies à texture compacte sur milieu solide, se répliquent mal et présentent un temps de latence important si on les repique alors sur YM. Si on croise une souche (col 1.) par une souche (COL 1.$^+$) par la technique des copies croisées, il est indispensable d'utiliser des souches "jeunes", ou d'opérer en liquide. Hormis ces cas particuliers, on peut facilement obtenir des diploïdes entre une souche conservée 3 ans au réfrigérateur et une souche isolée la veille, à condition de les transférer pendant une nuit sur milieu riche (type YE, PSM, YM ou même N5000 supplémenté): on n'a pas observé de sénescence.

La densité de l'ensemencement est un facteur assez important de l'efficacité de la conjugaison, mais beaucoup moins que chez *S. cerevisiae* où des fourchettes de concentration assez étroites ont été décrites (Fowell 1969), voir tableau 14. Le rapport des nombres de cellules compatibles mises en présence est important: s'il dépasse 100, on assiste à une chute brutale du nombre de prototrophes formés (tableau 14)

Tableau 14 - Influence de la densité d'ensemencement sur le nombre de prototrophes formés. Conditions identiques au tableau 13 - Milieu de croisement YM

Nombre de cellules mises s/ YM		Prototrophes pour 10^5 cellules étalées sur N5000
his1	lys13	
10^3	10^3	15
10^4	10^4	176
10^5	10^5	387
10^6	10^6	462
10^7	10^7	327
10^8	10^8	542
10^7	10^8	493
10^7	10^6	485
10^7	10^5	72
10^7	10^3	16
10^8	10^7	515
10^6	10^7	571
10^5	10^7	32
10^3	10^7	0

B. Etude de la sporulation

Au cours des expériences de conjugaison, on a souvent pu constater que des asques apparaissaient dès l'arrêt de la croissance (soit vers 4-5 jours sur YM et 6-7 jours sur V8). Ces asques sont assez rares dans une confrontation directe (de l'ordre au maximum de 1 pour 100 cellules végétatives), mais ils sont beaucoup plus fréquents dans un clone diploïde (environ 40% des cellules végétatives même dans un croisement entre souches sauvages). Le problème n'était donc plus tellement d'obtenir des asques à partir du moment où des diploïdes étaient faciles à isoler, mais d'avoir des souches formant de façon régulière des asques à 4 spores.

Nous rappellerons donc brièvement les quelques essais conduits sur les conditions de sporulation.

a) Conditions de milieu

Un diploïde issu du croisement his1 x lys13 a été testé sur différents milieux à 25°. Les résultats sont donnés dans le tableau 15 (diploïde précultivé une nuit sur PSM).

Les asques ont été recherchés après 7 jours d'incubation sur des suspensions soniquées: les asques sont libérés des hyphes mais ils ne sont généralement pas ouverts. Bassel et Mortimer (1973) ont constaté également que les asques formés dans des souches génétiquement peu éloignées des souches sauvages avaient une paroi très résistante; cette expérience est impossible avec des diploïdes améliorés. On estime à l'hématimètre le nombre d'asques correspondant à 1000 cellules végétatives environ.

On observe un effet prononcé du glucose; il semble que les cultures qui n'ont pu épuiser ce composé ne peuvent pas sporuler (comparer eau physiologique et eau glucosée, N5000 et N100 : la croissance s'arrête sur ce dernier milieu par épuisement de la source d'azote). Un léger effet activateur de l'extrait de levure, maximum avec le milieu V8C, est

../..

observé. Il est impossible à interpréter ici car il y a croissance des diploïdes sur tous les milieux qui contiennent de l'extrait, et on ne distingue pas entre conditions de présporulation et conditions de sporulation (Fowell 1969). Le fait que la sporulation puisse avoir lieu dans un milieu aussi simple que l'eau distillée est un phénomène courant chez les levures, mais il est indispensable de partir de cellules en bonne condition physiologique (ici sur PSM), voir plus bas.

On n'a pas observé de variation significative du nombre d'asques contenant 4 spores sur ces différents milieux. Une étude plus précise des conditions de sporulation pourrait être entreprise sur eau physiologique.

Tableau 15 - Influence du milieu sur le nombre d'asques formés après 7 jours à 25°C par un diploïde issu du croisement his1 x lys13.

Milieu testé	Concentration en glucose g/l	Nb d'asques et de cell.comptés	Nb asques observés	Pourcentage d'asques
YE	30	1215	0	< 0,1
PSM	20	1250	0	< 0,1
N5000	10	1320	198	15
N100	10	1880	0	< 0,1
YM	10	1640	475	29
MC11 (1)	1	850	274	32
F (2)	0	1912	287	15
V8	?	1215	382	31
V8C	?	852	360	42
Eau physiologique (3)	0	1016	124	12
Eau glucosée (3)	10	1513	0	< 0,1

(1) Voir tableau 13

(2) Milieu Fowell 0,4% acétate. Absence de croissance

(3) Milieux liquides agités (200 rpm). Absence de croissance

../..

b) Conditions d'ensemencement et de culture

Le milieu de sporulation V8C utilisé permettant une bonne croissance des levures, un repiquage sur milieu riche est théoriquement inutile. On a cependant observé plusieurs fois que des diploïdes conservés plusieurs jours sur YE au froid sporulaient mal si on les transférait directement sur V8, tandis qu'un bref passage (une nuit) sur PSM suffisait à restaurer entièrement la fertilité (voir tableau 16).

Tableau 16 - Effet d'un passage d'une nuit sur milieu PSM sur la fertilité du diploïde 8001 (his1, +/+, lys13)

Dates	Conditions d'ensemencement	Comptages après 7 jours sur V8		Fertilité
		Cellules	Asques	
29.10.72	Diploïde pris sur milieu d'isolement N5000	253	220	87%
19.7.75	Diploïde pris dans la collection (YE à 4°C)	173	53	30%
20.7.75	Diploïde repiqué une nuit sur PSM	167	139	83%

Un cas particulier illustre l'importance d'une phase de présporulation sur milieu "riche". Un diploïde phénotypiquement lys⁻ pousse mal sur milieu V8 et y sporule mal. Si on le cultive 24 H. sur milieu PSM, il sporule abondamment quand on le transfère en eau physiologique. On en conclut que c'est la phase de présporulation sur V8 qui est mauvaise; la fertilité du diploïde redevient normale si on supplémente le milieu V8 en lysine (100 mg/l) (voir tableau 17).

../..

Tableau 17 - Effet d'une phase de présporulation sur la sporulation du diploïde 9901 (A, lys 1.1, ade 1., + / B, lys 1.1, +, pyr1.).

Présporulation sur	Sporulation sur	Asques/cell.végétatives
V8	V8	4/1237
V8	eau physiologique + lysine	0/1532
PSM	eau physiologique	795/921
PSM	eau physiologique + lysine	627/732
V8 + lysine	V8 (+ lysine)	792/1010

c) Remarques sur la technique de croisement retenue

Le travail qui vient d'être décrit avait pour objectif essentiel de préciser les conditions dans lesquelles une approche génétique serait possible. On peut le résumer ainsi :

1. La conjugaison est un évènement rare qui n'est possible qu'en présence de glucose et d'extrait de levure.
2. Un stade diploïde stable existe, il n'a pas d'avantage sélectif particulier sur le milieu de conjugaison retenu (YM).
3. La sporulation intervient après l'arrêt de la croissance, elle n'a pas de besoin particulier, mais est inhibée par le glucose.

La technique de croisement retenue (auxotrophes sur YM, diploïdes sélectionnés par réplique) semble donc bien adaptée à l'induction et à la sélection ultérieures de rares caryogamies, mais elle présente un gros inconvénient : il faut s'assurer de la nature des clones sélectionnés. Un certain nombre d'entre eux peuvent correspondre à des réversions, à la germination d'ascospores recombinées prototrophes ou même à des diploïdes F2 formés entre ascospores compatibles. Cette dernière éventualité est cependant très peu probable car les spores ne peuvent sans doute pas fusionner sur un milieu YM

../...

sans glucose (l'épuisement du glucose est nécessaire à la sporulation) ni sur le milieu minéral de réplique, même supplémenté en acides aminés (voir MC79 et MC72, tableau 13); on n'a jamais vu de fusion dans l'asque. Le problème est alors de distinguer entre haploïdes et diploïdes, ce qui est testé par passage sur V8C (couleur après 5 jours). Ce test sert d'ailleurs essentiellement de confirmation, car la plupart des souches utilisées portent des marqueurs de morphologie coloniale qui sont récessifs dans le diploïde.

Le milieu de sporulation V8C n'est sans doute pas le meilleur milieu possible, parce qu'il impose un délai assez long à la formation des asques (2 à 3 jours). On l'a surtout utilisé parce qu'il confère une coloration particulière aux diploïdes sporulants.

III. AMELIORATION DES SOUCHES PAR CROISEMENT

A. Effet de croisements frères x soeurs

Avant d'étudier la ségrégation éventuelle de marqueurs génétiques à la méiose, il fallait disposer de souches formant régulièrement des asques à 4 spores ayant une bonne fréquence de germination.

Nous sommes partis d'un clone diploïde appelé D11, isolé dans le croisement his1 x lys13 précédemment décrit. Le nombre d'asques par rapport aux cellules végétatives est déterminé par comptage à l'hématimètre d'une suspension soniquée (500 à 1000 cellules) provenant d'une culture de 6 jours sur V8C à 25°. On détermine également sur 150 à 200 asques la répartition des spores dans les asques. Les spores sont alors isolées à la paraffine, comptées et étalées sur YE pour déterminer leur fréquence de germination (assez imprécis car les comptages sont difficiles dans la paraffine). Un certain nombre de descendants his^- et lys^- sont isolés par réplique et leur signe est déterminé par confrontation à deux souches compatibles portant le

../..

marqueur (pyr1.). Sur 50 descendants testés, 22 sont de signe A et 26 de signe B (2 ne se croisent pas) ce qui confirme le déterminisme monofactoriel du signe. On note que les associations parentales (his1, A) et (lys13, B) sont en partie conservées (18 his⁻ de signe A sur 22 descendants his⁻, 22 (lys⁻, B) sur 26).

Ces descendants sont alors croisés soit entre eux (série de diploïdes D19) soit en retour par l'un des parents (série D17): la répartition des asques à 2, 3 et 4 spores est déterminée comme précédemment, ainsi que le pourcentage moyen de germination.

On constate (voir tableau 18) que le nombre d'asques à deux spores est réduit de moitié au profit des asques à 3 et 4 spores dans certains diploïdes D19, et que la fréquence de germination s'accroit parallèlement. Les croisements en retour par le parent lys13 (dérivé de Z30) présentent, mais moins nettement, le même phénomène, tandis que ceux qui impliquent le parent his1 (dérivé de W29) sont homogènes et identiques à D11.

On note de plus que les confrontations qui font intervenir les souches his1, 11-14, 11-20 et 11-21 sont caractérisées par une majorité d'asques à 2 spores dont le pouvoir germinatif est faible, sauf si les deux parents appartiennent à cette série (voir D1907, D1703 et D1706) auquel cas seule la fréquence de germination est améliorée.

On a continué les croisements frère x soeur à partir des descendants des diploïdes qui n'impliquent pas ces souches. La série de diploïdes résultant est effectivement homogène et présente une majorité d'asques à 4 spores qui germent bien (série D28). Un nouveau croisement frère x soeur (série D80) confirme qu'on s'est bien débarrassé des déterminants d'une sporulation anormale.

Les ségrégations observées sur un certain nombre de ces diploïdes sont rapportées dans le tableau 19: on les a corrigées pour les contaminations de cellules végétatives dont la fréquence est toujours nettement inférieure à 1% (témoin sur 100 à 120 colonies prototrophes mises sur V8C), mais pas pour les clones mixtes.

Tableau 18 - Effet de croisements frère-soeur sur la sporulation de diploïdes issus du croisement his1 x lys13.

Série	Souches compatibles croisées (1) his⁻	Souches compatibles croisées (1) lys⁻	Diploïde (1)	% asques contenant (2) 2 sp	3 sp	4 sp	Asques dans la population(%)	Fréquence de germination des ascospores (%)
	A his1	B lys13	D11	90	8	2	35	1
	A 11-2	B 11-9	1901	55	18	37	42	40
	A 11-2	B 11-19	1902	42	33	25	45	28
	B 11-11	A 11-18	1903	37	34	39	52	42
D19	A 11-2	B 11-20	1904	87	10	3	48	2
	A 11-16	B 11-22	1905	55	30	15	37	36
	A 11-14	B 11-7	1906	82	12	6		5
	A 11-14	B 11-21	1907	99	1	< 1	43	29
	A 11-1	B 11-21	1908	88	8	4		2
	A his1	B 11-9	1701	89	6	5	31	
	A his1	B 11-19	1702	86	6	8	30	3
	A his1	B 11-20	1703	98	1	< 1	33	33
	A his1	B 11-22	1704	83	11	6		5
	A his1	B 11-7	1705	81	8	11	28	27
D17	A his1	B 11-21	1706	92	6	2		28
	A 11-2	B lys13	1707	41	35	24	41	42
	A 11-16	B lys13	1708	59	27	14	39	31
	A 11-14	B lys13	1709	93	5	2	44	1
	A 11-13	B lys13	1710	64	15	21		33
	A 1901-2	B 1901-20	2801	8	8	84	75	> 90
D28	B 1905-7	A 1905-14	2802	12	10	78		> 90
	B 1905-7	A 1905-13	2803	10	13	77		> 90
	B 1901-2	B 1901-18	2804	18	6	76		> 90
	B 2802-6	A 2802-11	8001	10	10	80		> 90
D80	A 2801-7	B 2801-12	8002	5	0	95	70	> 90

(1) Nomenclature : les souches portent le nom du diploïde d'où elles sont issues, précédé du signe, suivi du numéro d'ordre.

(2) On n'observe pas d'asques à 1 spore, on n'a pas essayé de compter les asques à zéro spore s'ils existent.

Tableau 19 - Evolution des ségrégations méiotiques des diploïdes issus du croisement his1 x lys13

Diploïde testé(1)	Phénotype des colonies présumées sporales			
	++	his⁻	lys⁻	hislys⁻
° D11	963	332	71	58
D1701°	778	276	152	51
° D1703°	1392	48	2	0
D1707	326	306	259	237
° D1709	542	233	43	29
D1901	427	243	229	115
D1902	273	154	205	159
D1903°	233	172	194	178
D1904°	943	316	52	49
D1905	372	237	217	184
° D1907°	1227	25	3	1
D2801	135	264	259	143
D2802	238	219	222	170
D2803	197	226	235	189
D2804	251	287	272	233
D8001	226	208	206	166
D8002	187	188	193	123

(1) Pour la nomenclature, voir tableau 18.

On a indiqué par un ° les souches parentales porteuses d'une anomalie "2 spores"; les deux parents de D1703 et D1907 sont porteurs de l'anomalie.

On constate une forte prédominance des colonies phénotypiquement prototrophes (et dans une moindre mesure his⁻) dans la descendance des diploïdes qui ont une majorité d'asques à 2 spores. Ce phénomène n'est sans doute pas dû à l'existence d'amas de spores (on n'en voit pas dans l'huile de paraffine) ni à une mauvaise germination des spores auxotrophes (sauf peut-être pour les doubles auxotrophes) mais plus probablement à l'existence de spores contenant plusieurs noyaux (voir plus bas). Il disparaît à peu près entièrement dans les diploïdes qui forment près de 80% d'asques à 4 spores (séries D28 et D80) et est au contraire très prononcé dans les cas où presque tous les asques sont à 2 spores (D1907 et D1703).

Bien qu'aucune explication ne puisse être définitivement proposée à ces phénomènes; on peut supposer qu'il existait dans les souches de départ un ensemble de gènes défavorables à la formation d'asques (leur proportion dans la population est à peu près doublée entre D11 et D28-D80) et à la germination des spores, ainsi qu'un système relativement simple dans la souche W29 contrôlant l'inclusion des noyaux dans les spores. Ce dernier système est étudié par le Prof. ESSER (Comm. pers.)

B. Essai d'isogénisation des souches par back-cross

a) Constitution des souches de référence

Les descendants du diploïde D 8002 présentent une grande variété de morphologies coloniales, indice d'une anisogénie résiduelle prononcée dans les souches mères (2801-7 et 2801-12) On a essayé de réduire cette variabilité par une série de croisements en retour par 2801-7: au bout de 6 croisements on atteint un coefficient d'inbreeding voisin de 1 (0,984) alors qu'il faudrait 19 générations de croisements frère x soeur pour atteindre un coefficient semblable (avec une probabilité de fixation voisine de 0,96).

La ségrégation des marqueurs (his1.) et (lys1.13) reste constante tout au long de ce processus (absence de liaison) ainsi que

../..

la fréquence de germination des spores (voir tableau 20). Le pourcentage d'asques anormaux ne semble pas augmenter, mais leur estimation devient plus difficile car bon nombre d'entre eux éclatent avant le comptage. La légère diminution du nombre d'asques dans la population a sans doute la même explication : on n'a pas observé d'effet d'inbreeding néfaste.

La variabilité morphologique des souches est considérablement réduite dès l'iso 2, mais elle ne disparaît pas complètement : on trouve qu'un gène (col1.) ségrège avec (his1.) dans plus de 99 spores sur 100 (1 recombiné (COL^+,his1.) sur 152 descendants his^- et his^-lys^- du diploïde 8041). Comme le marqueur (lys1.13) est caractérisé par la formation d'un pigment jaune sur milieu minéral supplémenté, on distingue sans peine les quatre phénotypes ++, his^-, lys^- et his^-lys^- sur un tel milieu. la liaion (his1.) signe est confirmée (16% de recombinaison).

Tableau 20 - Isogénisation des souches par back cross

Etape	Croisement	Diploïde	% asques dans la population	% asques anormaux (à 2,3 spores)	Fréquence de germination
iso 1	2801-7 x 2801-12	8002	70	5	100
iso 2	2801-7 x 8002-6	8011	82	3	100
iso 3	2801-7 x 8011-5	8024	65	7	100
iso 4	2801-7 x 8024-8	8032	60	2 ?	100
iso 5	2801-7 x 8032-3	8041	?	2 ?	100
iso 6	2801-7 x 8041-3	8051	?	2 ?	100

b) Isogénisation d'autres souches

Les descendants de 8051 auraient dû constituter en bonne logiqu le matériel de départ à l'établissement d'une collection de mutants. Cela n'a pas été fait essentiellement pour deux raisons. D'abord parce que la plupart des mutants lys^- utilisés

../..

dans ce travail avaient déjà été caractérisés aux plans biochimique et génétique (groupes de complémentation) à ce moment là. Ensuite parce que parallèlement à l'isogénisation des souches his1 et lys13, un certain nombre de croisements exploratoires avaient été faits et que des confrontations favorables (type série D19 ou D1707) avaient été repérées.

On a donc partiellement isogénisé aux souches de référence par trois croisements en retour seulement (coefficient d'inbreeding $\geqslant 0,75$) la plupart des souches lys$^-$ isolées et les marqueurs auxiliaires (ura1.), (arg1.), (arg2.) et (ura3.); les marqueurs (ade1.) et (ura2.) ont été croisés 4 fois (coefficient $> 0,90$). Ces croisements ne présentent pas d'intérêt particulier et ne seront pas décrits. On a vérifié la corrélation entre les phénomènes "excès de prototrophes" et présence d'asques à 2 spores (jusqu'à 50% des clones prototrophes sont mixtes) de sorte qu'aucune indication sur une aneuploïdie éventuelle des souches de départ n'a pu être obtenue.

C. Valeur des souches isogénisées.

Bien que la plupart des souches utilisées ne soient que très imparfaitement isogéniques, les exemples suivants illustrent la possibilité d'une analyse génétique.

a) Liaison des marqueurs

Les marqueurs (ura1.) et (arg2.) sont étroitement liés aux marqueurs (lys1.) comme le montre le tableau 21. Bien que les distances ne soient pas additives, on peut voir (tableau 22) que l'ordre probable est (lys1.1, ura1., arg2.).

../..

Tableau 21 - Liaison des marqueurs (lys1.1.), (ura1.) et (arg2.)

Génotype du diploïde testé	Ségrégations				Parents	Recombinés	Total	% recombinés
	- +	+ -	- -	+ +				
(A, ura1., +/B, +, lys1.1)	518	524	24	28	1052	52	1104	5
(B, arg2., +/A, +, lys1.1)	94	101	18	13	195	31	226	14
(A, ura1., +/B, +, arg2.)	104	112	19	14	216	33	249	13

Tableau 22 - Ordre des marqueurs (lys1.), (arg2.), (ura1.)

Génotype du diploïde testé	Recombinants (+, +, +)	Total	% recombinaison
(A, lys1.1, ura1., +/B, +,+, arg2.)	47	582	16
(A, lys1.1, +, arg2./B, +, ura1., +)	4	975	$\leqslant 1$

Dans le tableau suivant on a résumé l'ensemble des croisements qui aboutissent à la définition du groupe de liaison (lys6., lys2., lys3.) dans l'ordre indiqué : les gènes (lys2.) et (lys3.) sont très fortement liés, mais complémentent (voir 3ème partie). Les souches intermédiaires (lys3.14A, lys6.3) et (lys6.3, lys2.5) ont été isolées) comme ne complémentant pas de parents (lys3.), (lys6.) ou (lys2.).

Tableau 23 - Liaison (lys6.), (lys2.) et (lys3.)

Génotype du diploïde testé	Recombinants lys^+	Total	% recombinaison
(A, lys3.14A, +, +/B, +, lys6.3, his1.)	62	675	18
(A, lys3.12A, +, +/B, +, lys6.3, his1.)	54	593	17
(A, lys3.12A, +, +/B, +, lys2.5, ade1.)	12	1537	1,5
(A, lys3.12A, +, +, +/B, +, lys6.3, lys2.5, ura3.)	9	1322	1,3
(B, lys3.14A, lys6.3, ura3., +/A, +, +, +, lys2.5)	0	2281	< 0,1

b) Analyse de tétrades

L'existence d'anomalies chromosomiques ou la présence d'une combinaison de gènes létaux récessifs dans un croisement peut passer inaperçue lors de l'analyse en masse des sporées. Elle peut, par contre, se traduire au niveau des tétrades par l'existence de spores qui germent mal ou pas, ou par des ségrégations aberrantes. Nous n'avons malheureusement pu tester qu'un seul croisement par cette technique, et l'analyse a porté sur un très petit nombre de tétrades

On a disséqué 25 tétrades d'un diploïde (A, +, col2., ade1., lyc1.5, +/B, col1., +, +, +, lyc5.44) et obtenu 17 tétrades où les 4 spores ont germé, 7 où 3 ont germé et 1 où 2 ont germé. Si le pourcentage de germination observé, $f \simeq 0{,}90$ est dû uniquement à des causes expérimentales (lésion des spores), on s'attend à ce que la distribution des tétrades à 4, 3, 2, 1 ou 0 spores germées corresponde aux termes du binôme $|f + (1 - f)|^4$. Les fréquences théoriques attendues (0,66, 0,29 et 0,05) ne sont pas différentes des fréquences obtenues (0,64, 0,32 et 0,04). On en conclut que vraisemblablement il n'y a pas d'anomalie chromosomique majeure dans ce croisement. On ne peut cependant pas exclure un système polygénique de létalité. L'analyse des ségrégations n'a porté que sur des asques entiers, voir tableau 24.

Les 6 marqueurs étudiés montrent une ségrégation 2:2 régulière dans la majorité des tétrades. On retrouve la liaison (col1.)- signe : 8 spores recombinés sur 60 (on ne considère que les asques "normaux"). La faible liaison (30 uco environ) observée entre le signe et (ade1.) n'a jamais été observée par analyse en masse, elle peut résulter d'un effet d'échantillonnage (il faudrait analyser environ 100 spores avec une limite de sécurité de 5%).

On constate que pour les 15 couples d'allèles étudiés, il n'est pas d'exemple où sur 17 tétrades il ne s'en trouve pas au moins une anormale, et dans certains cas, jusqu'à 4.

../..

Tableau 24 - Analyse des tétrades d'un diploïde (A, +, col2., adel., lyc1.5, +/B, col1.,+,+,+; lyc5.44)

Spores		Signe	col1.	adel.	col2.	lyc1.	lyc5.
I.	1	B	-	+ et -	+	+	-
	2	A	+	+	+	-	+
	3	B	-	+ et -	-	+	+
	4	A	+	+	-	-	-
II.	1	A	+	-	+	+	-
	2	B	-	+	-	-	+
	3	B	-	+	+	-	+
	4	A	+	-	-	+	-
III.	1	B	-	-	-	-	-
	2	A	+	-	-	-	-
	3	A	+	+	+	+	+
	4	B	-	+	+	+	+
IV.	1	B	-	-	+	-	+ et -
	2	B	-	-	-	-	+
	3	A	+	+	-	+	+
	4	A	+	+	+	+	-
V.	1	B	-	-	-	+	+
	2	B	-	+	-	-	-
	3	A	+	-	+	-	-
	4	B	-	+	+	+	+
VI.	1	B	-	+	+	-	-
	2	A	+	-	+	+	+
	3	A	+	-	-	-	+
	4	B	-	+	-	+	-
VII.	1	A	+	-	-	+	+
	2	B	-	+	+	-	-
	3	A	+	+	-	-	+
	4	B	-	-	+	+	-

../..

Spores		Signe	col1.	ade1.	col2.	lyc1.	lyc5.
VIII.	1	A	+	-	-	+	-
	2	B	-	-	+	-	+
	3	A	-	+	-	-	+
	4	B	+	+	+	+	-
IX.	1	B	-	+ et -	-	+	+
	2	B	-	+	+	+	+
	3	A	+	+	-	-	-
	4	A	+	+ et -	+	-	-
X.	1	B	-	-	+	+	-
	2	A	+	-	-	-	+
	3	A	+	+	-	+	+
	4	B	-	+	+	-	-
XI.	1	B	+	+	+	+	+
	2	A	-	+	+	-	+
	3	B	+	-	-	-	-
	4	B	+	-	-	+	-
XII.	1	A	-	-	-	-	-
	2	B	-	+	+	+	+
	3	A	+	+	-	+	+
	4	B	+	-	+	-	-
XIII.	1	A	+	+	-	-	-
	2	B	+	-	-	-	+
	3	A	-	+	+	+	+
	4	B	-	-	+	+	-
XIV.	1	A	+	-	-	-	+
	2	B	-	+	+	+	+
	3	A	+	+	+	-	-
	4	B	-	-	-	+	+
XV.	1	A	+	+	-	+	-
	2	B	-	-	+	+	+
	3	B	-	-	-	-	-
	4	A	+	+	+	-	+

.../...

Spores	Signe	col1.	ade1.	col12.	lyc1.	lyc5.
XVI. 1	A	+	-	-	+	+
2	B	+	+	+	+	-
3	B	-	+	-	+	-
4	A	-	-	+	-	+
XVII. 1	A	+	+	+	-	-
2	B	-	-	-	+	-
3	A	+	-	+	+	+
4	B	-	+	-	-	+

Couple de marqueurs	Nombre de tétrades de chaque type			
	DP	DR	TT	Anormales
Signe - (col1.)	11	0	4	2
Signe - (ade1.)	6	0	7	4
Signe - (col2.)	3	1	11	2
Signe - (lyc1.)	3	2	9	3
Signe - (lyc5.)	4	2	7	4
(col1.)- (ade1.)	2	2	9	4
(col1.)- (col2.)	3	1	11	2
(col1.)- (lyc1.)	4	3	7	3
(col1.)- (lyc5.)	3	3	7	4
(ade1.)- (lyc5.)	2	4	7	4
(ade1.)- (col2.)	3	0	12	2
(ade1.)-(lyc1.)	3	3	8	3
(col2.)- (lyc1.)	2	0	14	1
(col2.)- (lyc5.)	2	3	10	2
(lyc1.)- (lyc5.)	2	4	8	3

../..

Ces anomalies de ségrégation sont généralement limitées à un seul marqueur par tétrade, de sorte qu'il ne semble pas s'agir d'erreurs d'isolement. On peut distinguer deux catégories d'anomalies.

- 4 tétrades semblent avoir subi une conversion : il y a eu conversion simultanée du signe et du marqueur lié (col1.) dans V et XI, conversion de (lyc5.) vers (LYC5$^+$.) dans XIV, et de (lyc1.) vers (LYC1.$^+$) dans XVI. Par réétalement des colonies correspondant à ces tétrades, on n'a pas trouvé d'autres phénotypes

- Les tétrades I et IX semblaient ségréger 4(+):o(ade1.) et la tétrade IV semblait avoir subi une conversion de (lyc5.) vers (LYC5$^+$). Dans ce cas les réétalements des colonies de départ montrent que I_1, I_3 , IV_1 , IX_1 et IX_4 étaient mixtes, mais uniquement pour les marqueurs à ségrégation anormale. Il peut s'agir d'une aneuploïdie résiduelle (mais qui n'entrainerait pas de létalité) ou de ségrégations postméiotiques.

La fréquence des tétrades anormales semble donc assez élevée, elle n'est pas décelable par analyse en masse. Il serait sans doute intéressant de savoir si ces phénomènes sont dus à un reste d'anisogénie des souches, ou s'ils correspondent à des évènements accompagnant normalement la méiose chez cet organisme.

D. Etude de la ségragation de mutations induites

Un problème qui s'est souvent posé au cours de ce travail, était de déterminer si un phénotype observé après mutagénèse était dû à une ou plusieurs mutations. Pour répondre à cette question, on croise la souche étudiée par une souche de référence et on suit la réapparition du ou des phénotypes mutants dans la descendance. Si un seul gène est en cause, le phénotype réapparaîtra dans un cas sur 2; s'il y a deux gènes, trois cas peuvent se présenter :

../..

Ou bien chaque gène correspond à un phénotype visible (ségrégation 3-:1+), ou bien un seul des gènes correspond à un phénotype décelable (l'autre est par exemple leaky) et la ségrégation sera apparemment monogénique, ou bien seule l'association des deux gènes correspond à un phénotype visible (ségrégation 3+:1-).

Malheureusement les phénomènes décrits dans le paragraphe A viennent compliquer cette étude, même si le mutant n'est pas induit dans une souche sauvage : on observe souvent dans le premier croisement par une souche de référence, une forte proportion d'asques à 2 et 3 spores et des ségrégations très anormales. On a supposé que ces asques ne résultaient pas d'une dégénérescence des noyaux, mais d'une délimitation anormale de la paroi des spores qui englobaient 1 à 3 noyaux : cette hypothèse est renforcée par le fait qu'on observe souvent dans ce cas des spores de taille anormale. Si elle est exacte, on peut calculer la fréquence de réapparition des marqueurs dans les asques à 2 et 3 spores, et on aboutit aux formules suivantes (voir fig.13A-F

- Cas de 1 marqueur a/+ (fréquence f (a) de réapparition d'un phénotype a)

$$f(+) = \frac{1}{2} f\,IV + \frac{19}{24} f\,II + \frac{7}{12} f\,III$$

$$f(a) = \frac{1}{2} f\,IV + \frac{5}{24} f\,II + \frac{5}{12} f\,III$$

- Cas de 2 marqueurs a/+ et b/+ non liés

$$f(+) = \frac{1}{4} f\,IV + \frac{67}{144} f\,II + \frac{35}{108} f\,III$$

$$f(a) = \frac{1}{4} f\,IV + \frac{47}{144} f\,II + \frac{31}{108} f\,III$$

$$f(b) = \frac{1}{4} f\,IV + \frac{19}{144} f\,II + \frac{23}{108} f\,III$$

$$f(ab) = \frac{1}{4} f\,IV + \frac{11}{144} f\,II + \frac{19}{108} f\,III$$

où f IV, fIII et f II sont respectivement les proportions d'asques à 4, 3 et 2 spores de la population totale.Cette fréquence est déterminée par examen au microscope des croisements avant isolement en masse.

../..

Fig.13 Ségrégations dans les asques à spores plurinucléées.

I- Cas d'un couple a/+

A- 2 spores (2noyaux + 2 noyaux)

3 types de spores:

4/6 (+) 1/6 (a) 1/6 (+)

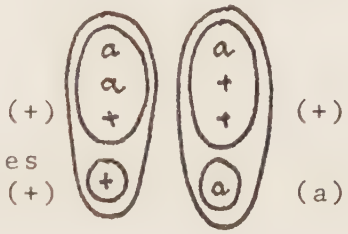
5/6 (+)
1/6 (a)

On a une chance sur deux de tirer a parmi aa++ } soit 1/6 de aa
une chance sur trois pour a parmi a++ }

Même raisonnement pour ++ et a+ . Phénotypes entre parenthèses, voir texte.

B- 2 spores (3 noyaux + 1 noyau)

2 types d'asques équiprobables

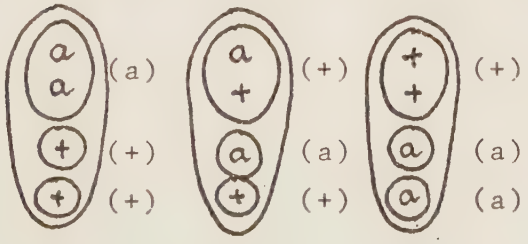


1/4 (a)
3/4 (+)

Si on admet que les cas A et B ci-dessus sont aussi féquents, on a pour les asques bisporés:

Probabilité de (a): 5/24
Probabilité de (+): 19/24

C- 3 spores (2noyaux + 1 noyau + 1 noyau)



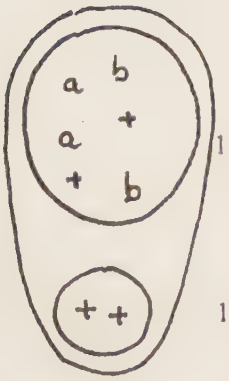
1/18 4/18 1/18

11/18 (+)
7/18 (a)

On a représenté les 3 types d'asques possibles sans tenir compte de l'ordre des spores ou des noyaux. La fréquence des spores dinucléées de chaque type est égale aux fréquences des 2spores mononucléées qui les accompagnent: on obtient pour chacune des spores d'un asque donné les fréquences indiquées.

II- Cas de deux couples a/+ et b/+

D- 2 spores (3 noyaux + 1 noyau + noyau)



1/8 → ab / ab / ++ (+)

1/8 → a+ / ab / +b (a)

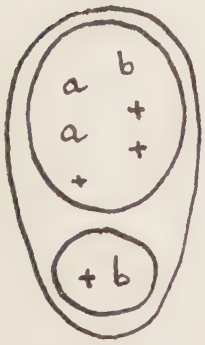
1/8 → ++ (+)

On a une chance sur 3 d'associer un + et un + .

1/3 — 1/24 (+)

2/3 — 2/24 (a)

3/24 (+)



1/8 → ab / a+ / ++ (+)

1/8 → a+ / a+ / +b (a)

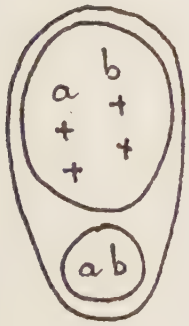
1/8 → +b (b)

On a 2 chances sur 3 d'associer a^+ à b^+.

2/3 — 2/24 (+)

1/3 — 1/24 (a)

3/24 (b)



1/8 → ab / ++ / ++ (+)

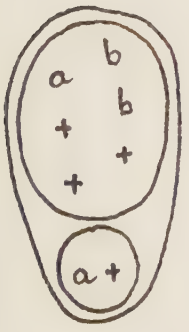
1/8 → a+ / +b / ++ (+)

1/8 → ab (ab)

Toutes les spores sont (+)

1 — 3/24 (+)

3/24 (ab)



1/8 → ab / +b / ++ (+)

1/8 → a+ / +b / ab (a)

1/8 → a+ (a)

On a 2 chances sur 3 d'associer b^+ à a^+.

2/3 — 2/24 (+)

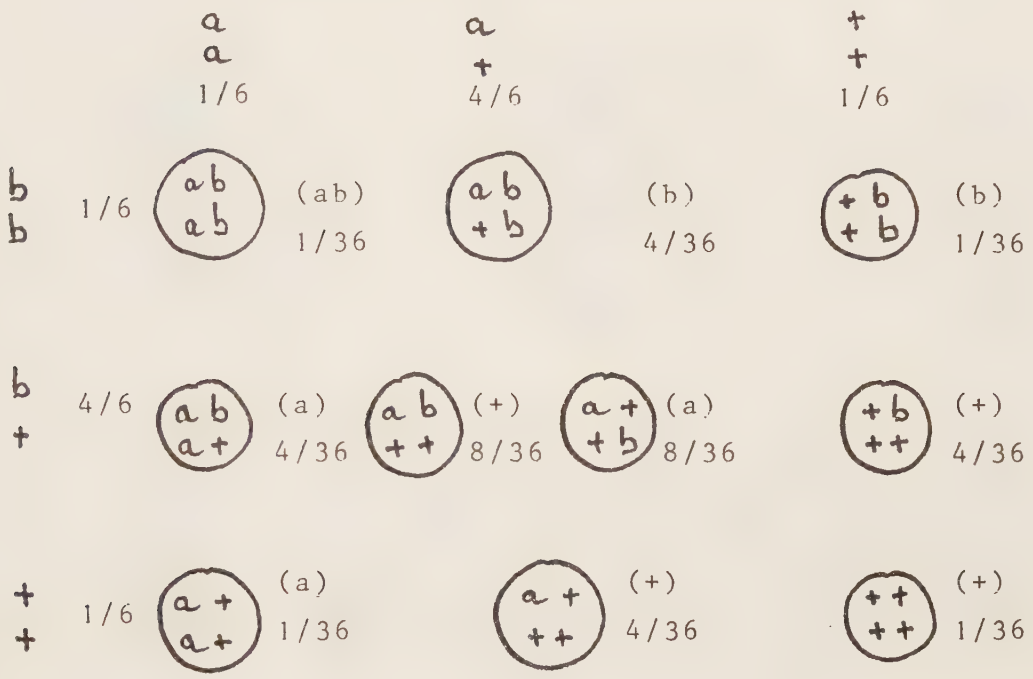
1/3 — 1/24 (+)

3/24 (a)

On a indiqué à gauche les répartitions possibles des marqueurs dans les spores, sans préjuger de leur association dans les noyaux. Au centre, on a représenté les associations possibles des marqueurs dans la spore trinucléée, sans s'occuper de leur ordre, les phénotypes correspondants entre parenthèses et la fréquence de ces associations pour chaque spore trinucléée.. On a rassemblé à droite les probabilités de chaque phénotype dans la population des spores issues de tels asques

(+): 11/24 (a): 7/24 (b): 3/24 (ab): 3/24

E- 2 spores (2 novaux + 2 noyaux).

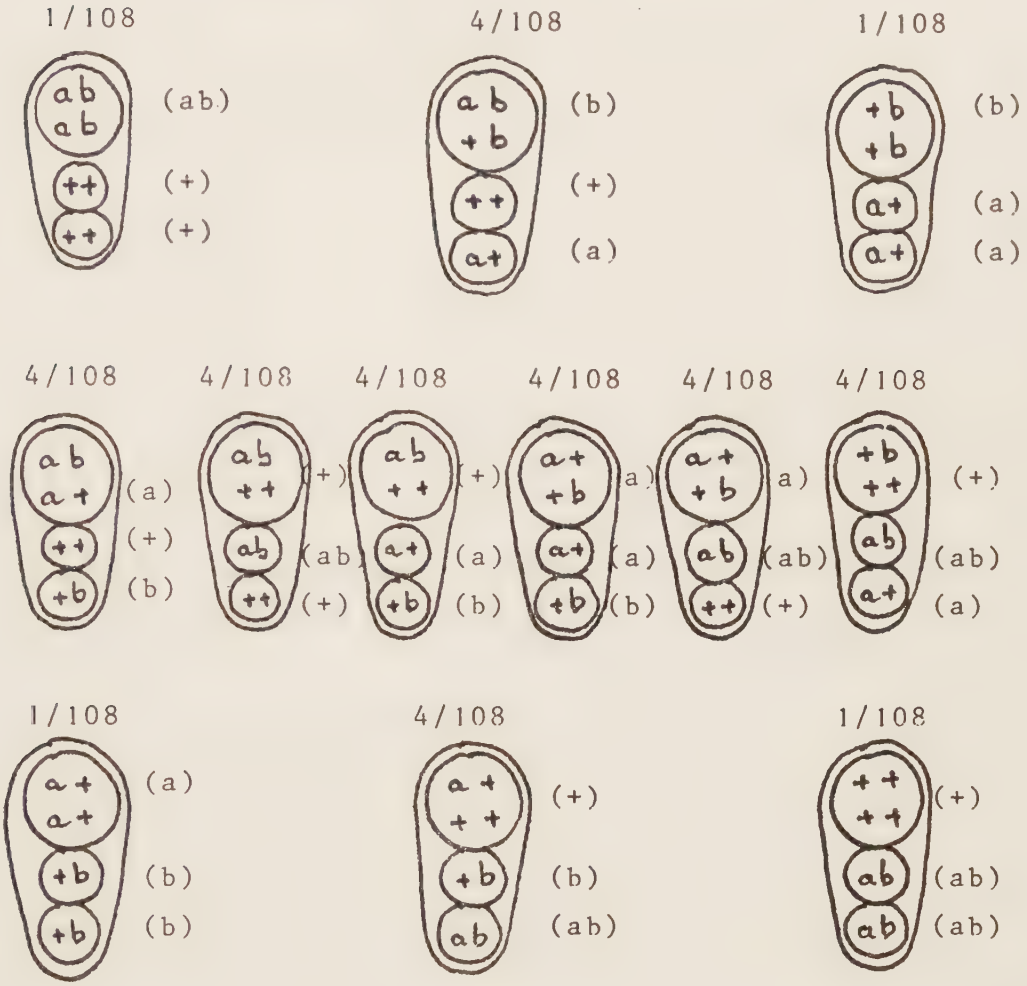


La fréquence des diverses combinaisons des deux marqueurs est obtenue en multipliant les fréquences individuelles de la fig. A. On a indiqué à droite de chaque type de spores le phénotype correspondant entre parenthèses, et la fréquence.

(+): 17/36 (a): 13/36 (b): 5/36 (ab): 1/36

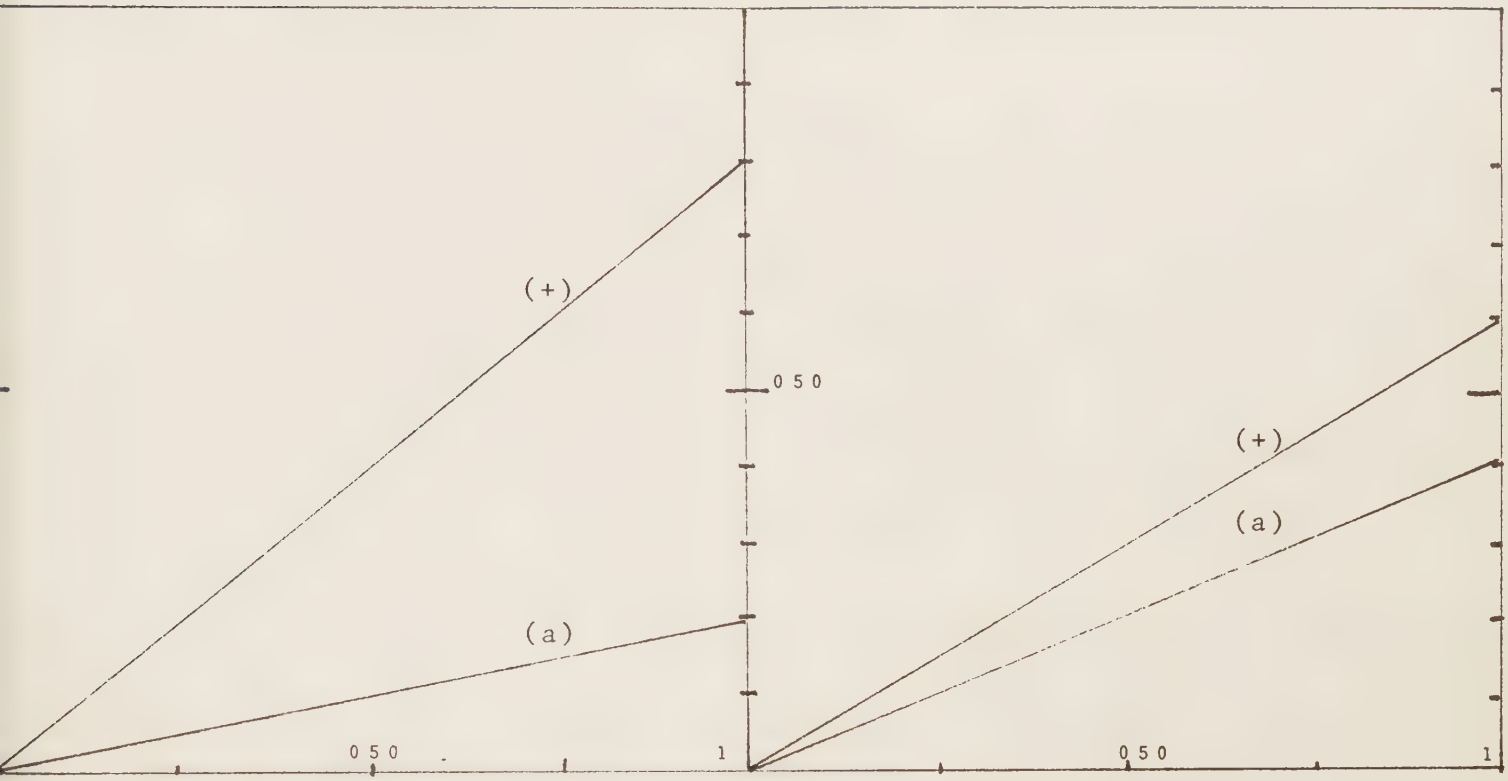
On obtient les résultats présentés dans le texte en ajoutant les fréquences obtenues ici à celles de la fig. précédente (réapparition des phénotypes dans les asques à 2 spores).

F- 3 spores (2 noyaux + 1 noyau + 1 noyau)



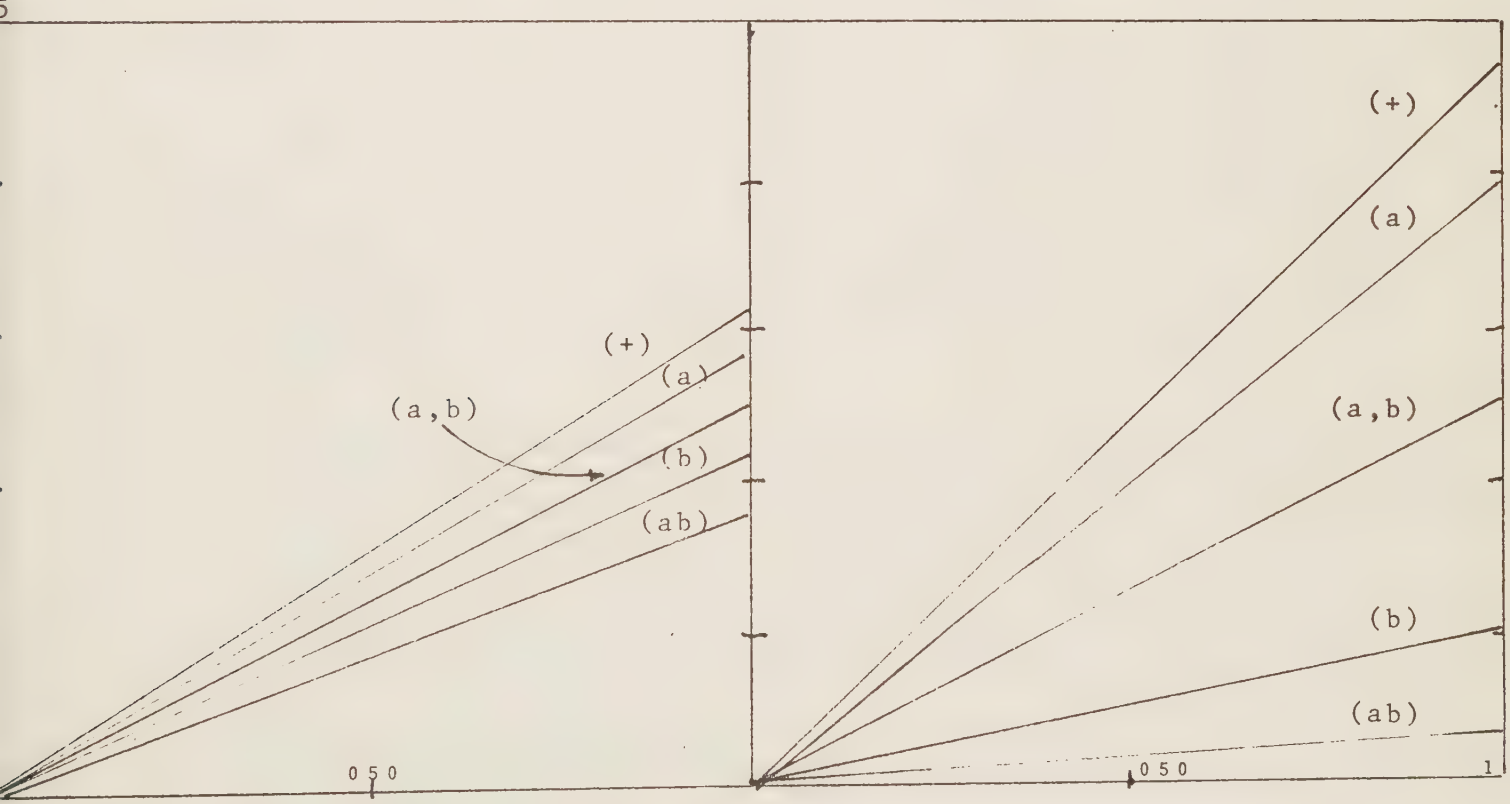
Les fréquences de chaque association de 2 noyaux ont été prises sur la fig. A. On a indiqué au-dessus de chaque type d'asque la fréquence de chacune des spores (mono- ou dinucléées) qui le composent. Les phénotypes sont indiqués entre parenthèses, on ne tient pas compte de l'ordre des spores ou des noyaux dans les spores.

(+): 35/108 (a): 31/108 (b): 23/108 (ab): 19/108



f(asques à 2)

f(asques à 3)



f(asques à 3)

f(asques à 2)

Fréquence de réapparition des marqueurs (en ordonnée) dans le type d'asque indiqué, pour une fréquence donnée de ce type d'asque dans la population (en abscisse).

1 couple de marqueurs en haut; 2 en bas.

Pour ce calcul on a supposé que :

- le masquage des phénotypes dans un clone mixte était absolu, c'est-à-dire qu' un clone issu d'une spore contenant deux déterminants a et un déterminant + apparaissait phénotypiquement +. De même on a supposé que a+ masquait entièrement ab, et que a+ masquait +b. Ceci n'est pas toujours vrai, et on peut avoir apparition aléatoire du phénotype a ou b (en particulier s'il y a des secteurs), dans ce cas on a bien sûr:
  $f(a) = f(b) = \frac{1 - [f(+) + f(ab)]}{2}$
- les asques à deux spores pouvaient être aussi bien de type 2 + 2 que de type 3 + 2. Si ce n'est pas le cas, en particulier si seul le cas 2 + 2 existe dans ces spores, les fréquences ne sont pas grandement modifiées, sauf dans le cas d'un croisement à deux marqueurs où f (ab) serait surestimée (environ doublée si f II = 1) et f (a) légèrement sous-estimée.

Tout ceci n'est bien sûr valable que si la létalité des spores à la germination est faible ou aléatoire (spores provenant d'asques non mûrs). On peut avoir une représentation graphique simple de la fréquence de réapparition des marqueurs en fonction de la proportion d'asques à 2 ou 3 spores (voir fig. 13-G), ce qui permet de calculer aisément la fréquence de réapparition des marqueurs dans la population.

Nous donnerons ci-dessous trois exemples effectivement rencontrés. On remarquera que cette approche n'est possible que si l'une des deux souches impliquées dans le croisement n'est pas porteuse des déterminants de la répartition anormale des noyaux (elle n'explique pas les résultats du tableau 19, sauf pour 8001 et 8002).

a) Etude de la souche lys12.

On a croisé la souche lys12 issue de Z30 par une souche de référence (his1.). Au moment de l'isolement des spores, on compte 70% d'asques à deux spores, 20% d'asques à trois spores, et 10% d'asques à quatre spores. La viabilité des spores avoisine 80%, bien que leur taille soit très variable. On observe

après réplique sur milieux sélectifs 154 colonies lys^+ et 196 colonies lys^- sur 350 colonies testées (44% et 56%).

En appliquant les formules décrites ci-dessus, on voit que les fréquences théoriques attendues, s'il n'y a pas de létalité, sont :

- s'il y a un gène lys^- : $f(+) = 0,55 + 0,12 + 0,05 = 0,72$

  $f(lys^-) = 0,15 + 0,08 + 0,05 = 0,28$

- s'il y a deux gènes lys^- a et b :

  $f(+) = 0,325 + 0,065 + 0,025 = 0,415$

  $f(ab) = 0,025 + 0,035 + 0,025 = 0,085$)

  $f(a) + f(b) = 1 - [f(+) + f(ab)] = 0,500$) $f(lys^-) = 0,585$

Les résultats obtenus s'accordent mieux avec la seconde hypothèse. On a pu vérifier ultérieurement par complémentation, puis par test enzymatique qu'il y avait effectivement deux mutations lys^- : (lys3.12A) et (lys5.12B) dans la souche lys12.

b) Etude de la souche lys14

On a croisé cette souche comme lys12 et mesuré f II = 0,80, f III = 0,15 et f IV = 0,05. La fréquence de germination des spores n'est que de 60%. On observe 381 colonies prototrophes et 166 colonies lys^- sur 547 (soit environ 70 et 30%). Si un seul gène est en cause, on attend 74% de prototrophes, on n'en attend que 43% s'il y en a deux comme ci-dessus. Les résultats obtenus sont plutôt en faveur d'un seul gène. On recroise une série de descendants lys^- par la souche de référence (his1.) et on analyse le croisement qui donne la plus forte proportion d'asques à 4 (f IV = 0,80). On obtient effectivement 175 lys^+ pour 162 lys^-.

Si on croise ces descendants par des souches (lys3.12A), on constate que la moitié d'entre eux complémentent fortement la

../..

mutation (lys3.) tandis que l'autre ne complémente pas ou faiblement. On pouvait supposer :

- soit que la moitié des descendants "lys14" portaient un suppresseur dominant de (lys3.12A), mais que la mutation portée par lys14 était allèle de (lys3.12A),

- soit que la souche lys14 était digénique, la mutation allèle de (lys3.12A) était trop "leaky" pour apparaître seule. Elle apparaîtrait par complémentation une fois sur deux dans les souches porteuses de la mutation principale.

Bien qu'a priori moins probable, c'est la seconde hypothèse qui s'est révélée juste : la souche lys14 est (lys3.14A, lys4.14 B) mais seule la mutation portant sur l'aminoadipyl δ semialdéhyde glutamate réductase (lys4.14B) correspond à un phénotype net. Les souches (lys3.14A) sont leaky et poussent en trois jours sur N5000

c) Etude de la souche ril14

Les souches incapables de cataboliser la lysine, porteuses de la mutation (lyc1.5) sont sensibles à cet acide aminé en milieu N100 (voir 4è partie). Afin d'étudier cette sensibilité, on a isolé un certain nombre de résistants à la lysine (mutants ril) dans une souche (lyc1.5, LYS1.5). Sur 92 résistants isolés, 87 dégradent la lysine, 4 ne la dégradent pas et la dernière souche (ril14) la dégrade mal et a un besoin en lysine, compensable par 1 g/l de lysine (et non 100 mg/l comme d'habitude). On a pu montrer que la souche de départ portait une mutation de perméation qui explique ce besoin élevé en lysine dans le mutant et le fait qu'il pousse mal sur lysine source de carbone : ce point ne sera pas abordé ici. La souche ril14 est donc :

- révertante pour (lyc1.5) : elle dégrade la lysine
- mutante pour la biosynthèse de la lysine : elle est homocitrate synthétase$^-$

../..

Le problème était alors de savoir si les deux phénomènes étaient liés, ou si au contraire il y avait eu double mutation. On constate que les deux phénotypes sont entièrement récessifs, c'est-à-dire que le diploïde résultant d'un croisement ril 14 x (lyc1.5) est prototrophe et ne dégrade pas la lysine. On en déduit que (lyc1.5) est probablement présente dans ril14.

Le diploïde est mis à sporuler et on observe f II = 20%, f III = 10% et f IV = 70%. Sur 342 colonies issues de spores, 188 sont lys^+ et 154 lys^- (on attendait 56 et 44%). Toutes les colonies lys^- poussent sur lysine source de carbone. Après purification par stries, on constate que sur 32 colonies lys^+ testées toutes sont incapables de cataboliser la lysine (phénotype lyc^-).

On recroise une souche lys^- lyc^+ par une souche de référence (his1.) et on observe dans la descendance (f IV >80%) : 243 lys^- lyc^+, 132 lys^+ lyc^+ et 128 lys^+ lyc^-. La classe lys^- lyc^- n'apparaît jamais : on en déduit que la mutation d'auxotrophie supprime la mutation (lyc1.5) ou bien qu'elle est très liée à un suppresseur de cette mutation. La mutation lys^- a été appelée (lys11.23).

Conclusion.

Au terme de ce chapitre, on peut considérer que rien ne s'oppose plus à une étude génétique de *S. lipolytica*. On peut facilement obtenir des mutants biochimiques, réaliser un test de complémentation et étudier le déterminisme génétique d'un caractère. Il est possible de construire des souches à génotype complexe.

Ces études sont bien sûr plus simples à conduire si les souches étudiées sont proches des souches de référence, elles sont encore possibles s'il s'agit de mutants induits dans une souche sauvage. Ce dernier point revêt un intérêt particulier pour l'emploi éventuel de ces techniques dans un programme de génétique appliquée : il est probable que, dans ce cas, la souche "sauvage" constituera le matériel de départ dans lequel seront induites les mutations intéressantes, ne serait-ce que parce que ses caractéristiques de croissance seraient supérieures à celles des souches de référence.

Troisième Partie

ETUDE DE MUTANTS AFFECTES DANS LA BIOSYNTHESE DE LA LYSINE

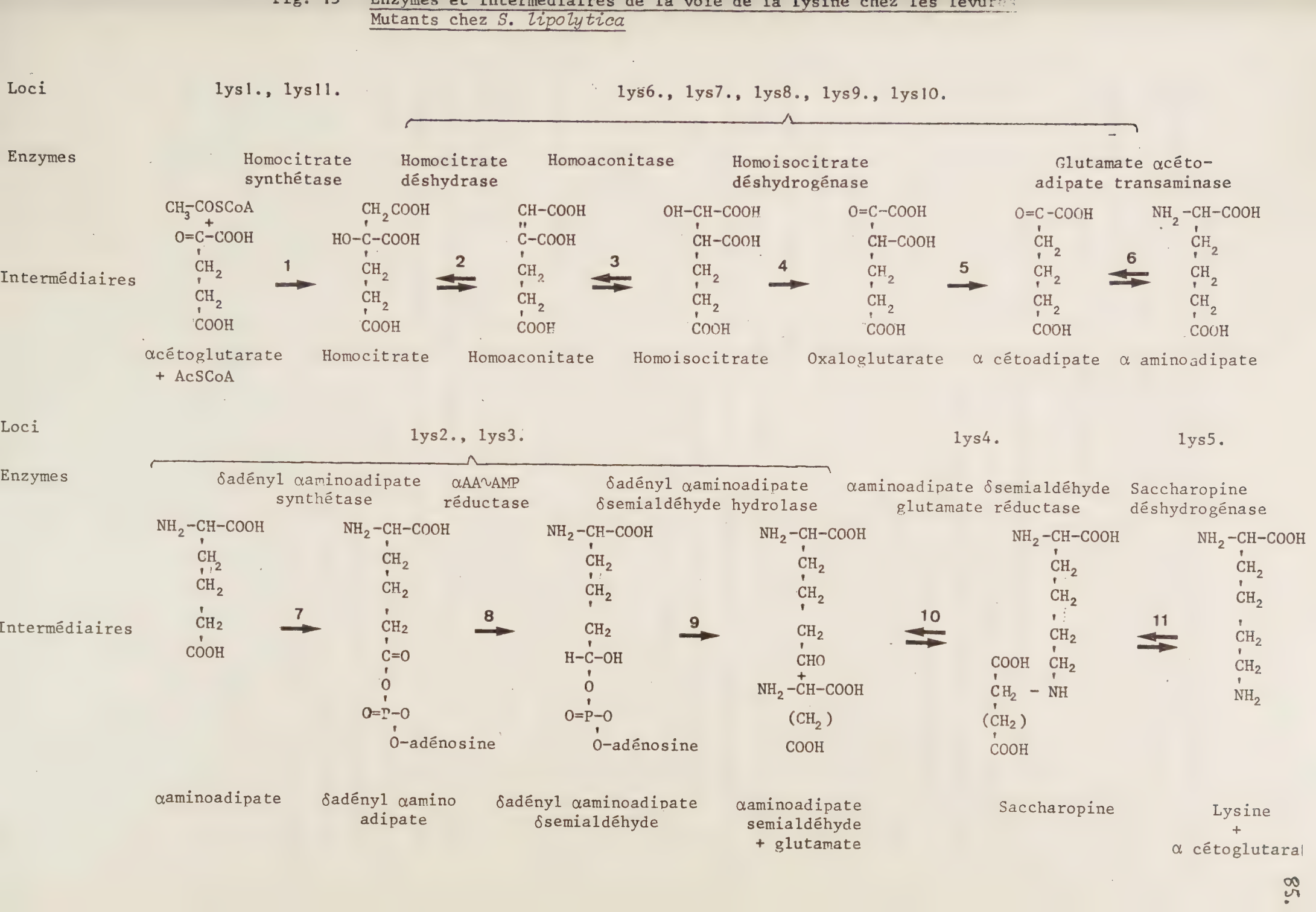
Les grandes lignes de la biosynthèse de la lysine chez *S. cerevisiae* et *Neurospora crassa* sont bien connues et semblent pouvoir s'appliquer à la totalité des champignons (voir Vogel 1965). De nombreux points toutefois, en particulier ceux qui touchent à la régulation de cette voie et au nombre exact d'étapes impliquées, restent encore peu clairs.

Depuis les travaux de Mitchell et Houlahan (1948), on sait que chez *Neurospora crassa*, certains mutants lysine-moins peuvent utiliser l'α aminoadipate mais pas le diaminopimélate pour assurer leur croissance. Sur la base d'études d'incorporation de (^{14}C) acétate dans la lysine chez la levure, Strassman et Weinhouse (1953) proposèrent une voie différente de celle des bactéries ou des plantes vertes débutant par la condensation d'acétate sur l'α cétoglutarate et conduisant à la formation d'α cétoadipate par une suite de réactions en tous points analogues à celles qui, dans le cycle de Krebs, permettent de passer de l'oxaloacétate à l'α cétoglutarate. La présence d'homologues supérieurs des intermédiaires du cycle de Krebs et l'existence des réactions enzymatiques correspondantes furent ensuite effectivement décrites : conversion de l'acétate et de l'α cétoglutarate en homocitrate (Strassman et Ceci 1964, Hogg et Broquist 1968), transformation réversible du cis-homocitrate en homoisocitrate (Strassman et Ceci 1966, Bhattacharjee et Strassman 1967), formation enfin de l'α cétoadipate à partir de l'homoisocitrate (Strassman et Ceci 1965). Une transaminase spécifique permet alors la formation d'α aminoadipate (Matsuda et Ogur 1969) et clôt ce qu'il est convenu d'appeler la partie précoce de la biosynthèse de la lysine chez les levures (voir fig. 15).

L'analogie et peut-être l'origine commune de cette séquence de réactions et de celles du cycle de Krebs sont encore indiquées par l'existence d'une localisation cytologique identique (Betterton et al 1968)

../..

Fig. 13 Enzymes et intermédiaires de la voie de la lysine chez les levures
Mutants chez *S. lipolytica*



par l'analyse des configurations stéréochimiques des intermédiaires impliqués (Thomas et al 1966, Strassman et Ceci 1966, Chilina et al. 1969) et par l'existence de mutations uniques affectant les deux systèmes (les mutants glt_2(= lys8) et lys6 de *S. cerevisiae* sont aconitase$^-$, Ogur et al 1966, Sherman 1963).

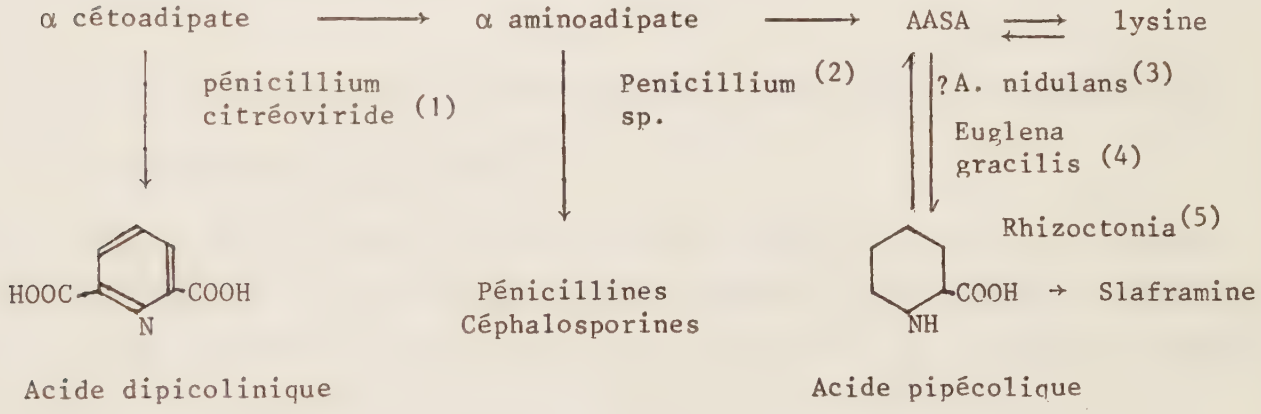
La seconde partie de la voie n'est plus spécifique des Champignons et fonctionne pour la dégradation de la lysine chez les Mammifères (Higashino et al 1965) et sans doute chez les Plantes (Nabeta 1973). Elle comporte schématiquement une réduction de l'α aminoadipate en α aminoadipate semialdéhyde suivie d'une amination en ε, mais cette suite de réactions est particulière à plus d'un titre. La réduction de l'α aminoadipate se fait par un procédé qui rappelle la réduction de l'aspartate en aspartylsemialdéhyde, mais la réduction a lieu au niveau d'un composé adénylé qui est hydrolysé dans une troisième étape (Sagisaka et Shimura 1961). La transamination de l'aminoadipate semialdéhyde par le glutamate fait intervenir un intermédiaire stable, la saccharopine, qui est hydrolysé en α cétoglutarate et lysine ou peut s'accumuler dans certaines conditions (Trupin et Broquist 1965). Si on néglige la compartimentation de la voie de biosynthèse (la seconde partie est cytoplasmique), on peut assimiler l'ensemble de cette voie de biosynthèse à un cycle dont l'activité dépendrait de la présence d'acétate et de glutamate (voir fig.2 de la première partie).

On a pu établir chez *S. cerevisiae* la correspondance gène-enzyme pour un certain nombre d'étapes (Bhattacharjee et Sinha 1971). L'absence de certains mutants (homocitrate synthétase$^-$ et α cétoadipate glutamate transaminase$^-$ notamment) serait dûe à l'existence d'isoenzymes (Tucci et Ceci 1972a, Betterton el al.1968). On constate également que sur 6 relations établies, 3 sont complexes : les loci lys7 et lys8 contrôlent l'homocitrate déshydrase, lys2 et lys5 contrôlent l'AASA hydrolase, enfin lys9 lys13 et lys14 contrôlent l'AASA réductase. Le rôle de ces loci indépendants, susceptibles de complémenter <u>in vivo</u> mais pas <u>in vitro</u>, dans le contrôle de la même étape enzymatique est encore inconnu (Ogur et al. 1965, Sinha et Bhattacharjee 1970, Hwang et al. 1966).

../..

La régulation de la voie est assez mal comprise. On a décrit une régulation par la lysine, comprenant une répression coordonnée des trois premiers enzymes (Bhattacharjee 1970) et une rétroinhibition du premier enzyme (Maragoudakis et al. 1967). Il semble toutefois que la lysine n'ait pas in vivo d'effets très importants à ces niveaux (Tucci et Ceci 1972b) et qu'elle agisse plutôt sur la seconde partie de la chaîne, après l' α aminoadipate en un point qui reste à préciser. Il est par ailleurs possible que la lysine ne soit pas le seul effecteur: chez la plupart des Champignons, on a décrit des voies secondaires branchées après l'oxaloglutarate, dont les produits terminaux pourraient être des coeffecteurs, voir fig.16

Fig.16 - Branchements connus de la voie de biosynthèse de la lysine



(1) Tanenbaum et Kaneko (1964)
(2) Abraham et Newton (1967)
(3) Aspen et Meister (1962)
(4) Rothstein et Saffran (1963)
(5) Guenguerich et al. (1973)

Si les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse elle-même sont encore mal connus, on ne sait pratiquement rien sur ceux qui assurent son intégration au reste du métabolisme. A côté de phénomènes dont le rôle physiologique reste inconnu (inhibition de l'aspartokinase par la lysine chez *S. cerevisiae* (de Robichon Szulmajster 1967),, répression de l'ornithine transcarbamylase par la lysine (Ramos et al. 1970), on a récemment décrit (Tracy et Kohlhaw 1975) une inactivation

../..

spécifique de l'homocitrate synthétase et de l'α isopropylmalate synthétase par le CoA : ces deux enzymes, tous deux intramitochondriaux et consommateurs de CoA seraient partiellement régulés par le rapport CoA/AcCoA, tandis que la citrate synthétase y échapperait.

I. ETUDE DE MUTANTS AUXOTROPHES

L'isolement de mutants auxotrophes a été conduit dans un double but : vérifier la nature de la voie de biosynthèse utilisée par *S. lipolytica* et disposer d'un matériel de base pour l'étude de la régulation de la voie. Ces mutants ont tous été sélectionnés par réplique d'un milieu complet sur un milieu minimum : on n'a pas observé de mutants présentant un double besoin (lysine et autres), ce qui n'est peut-être dû qu'au faible nombre de souches étudiées.

A. Croissance sur les intermédiaires de la voie et accumulation

a) Croissance sur lysine

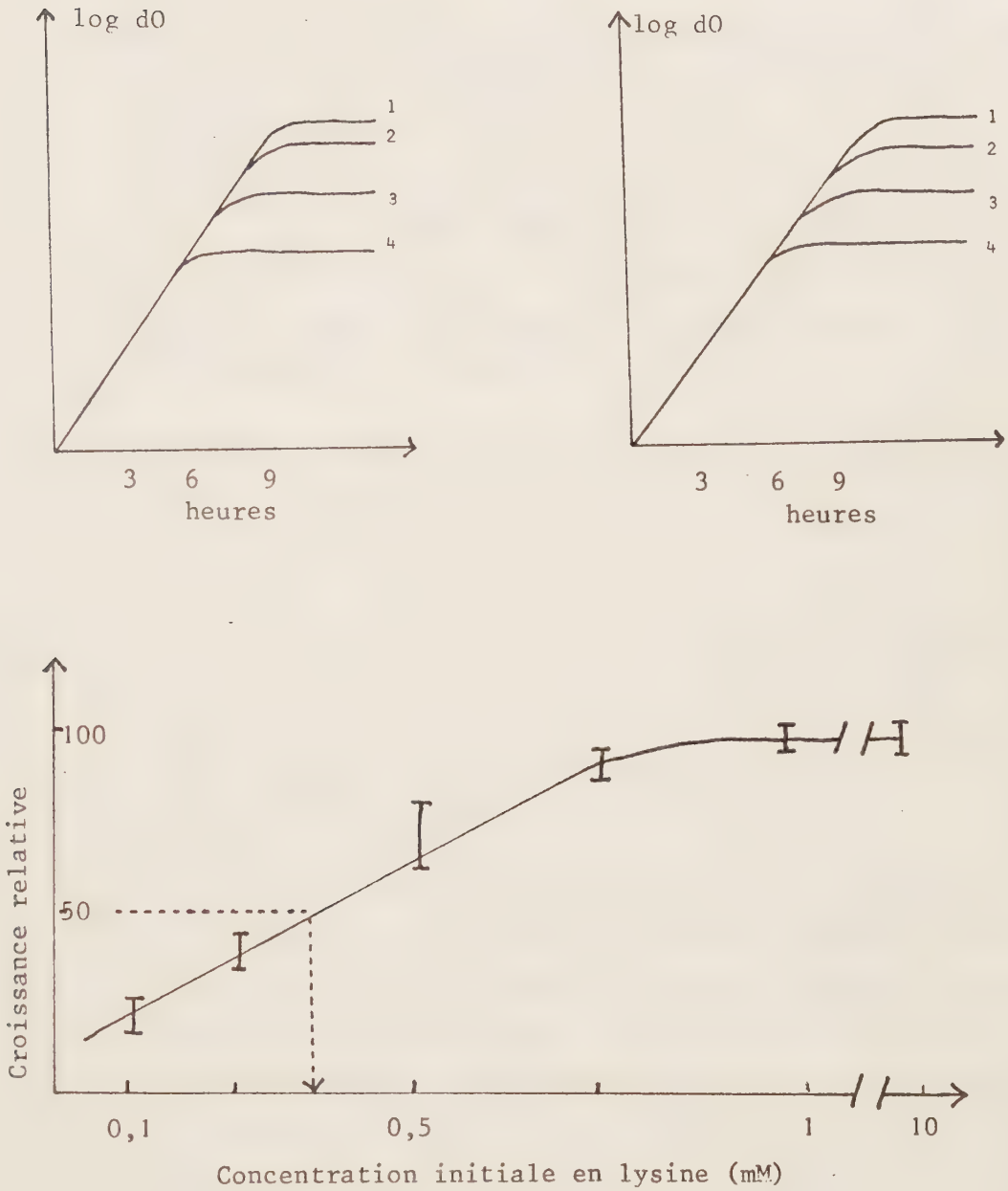
Tous les mutants isolés poussent bien sur lysine en milieu N5000 après isogénisation. On observe une réponse linéaire de l'augmentation de la masse cellulaire à la lysine fournie pour une gamme de concentrations comprise entre 5.10^{-5} et $7,5.10^{-4}$M: cette réponse est identique pour toutes les souches testées (voir fig.17) ce qui permet de supposer que toutes les souches utilisées présentent un besoin exclusif (ou très prépondérant) en lysine, et qu'il n'y a pas d'accumulation d'intermédiaires inhibiteurs. Si la croissance est limitée par la lysine, la phase de transition entre les phases exponentielle et stationnaire est très brève (moins de 2 H.), (voir fig.17); il sera sans doute difficile de travailler en "batch" dans des conditions de lysine limitante.

b) Croissance sur intermédiaires - Transport de l'α aminoadipate

Parmi les composés testés (homocitrate, α aminoadipate, α cétoadipate, pipécolate, diaminopimélate et saccharopine) seul l'α aminoadipate permet de compenser le besoin en

../..

Fig. 17 Croissance des auxotrophes lysine⁻.



On a représenté en haut les courbes de croissance de lys5 (à gauche) et de lys8 (à droite) en fonction de la quantité de lysine initialement ajoutée au milieu: [1] 1 mM; [2] 0,5 mM; [3] 0,25 mM; [4] 0,1 mM.

On a représenté en bas la croissance relative de 14 mutants lys⁻, lys1 à lys14, en fonction de la quantité initiale de lysine présente dans le milieu (100% =valeur sur 10 mM lys). Les barres représentent la dispersion observée.

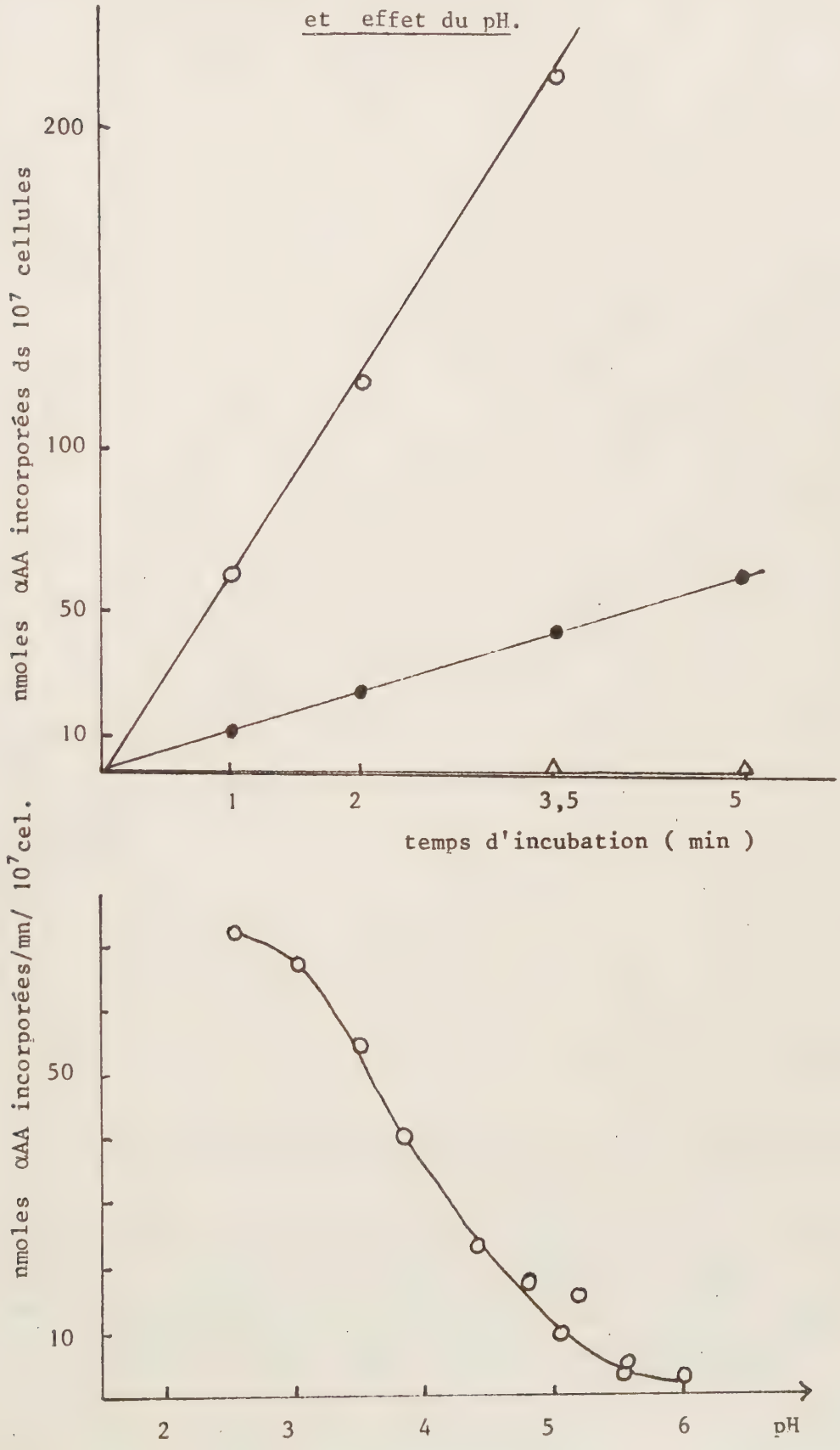
lysine de certains mutants. La croissance sur N5000 supplémenté en α aminoadipate est lente et ne démarre qu'après un lag important (2 à 4 jours). Par ailleurs, un premier essai de classification des mutants isolés en mutants "précoces" ou "tardifs" (selon qu'ils poussaient ou non sur αAA) s'est avéré imparfait : un grand nombre de mutants classés tardifs (non utilisateurs d'α aminoadipate) étaient en fait bloqués en début de la voie.

Ceci nous a amenés à étudier rapidement les conditions de transport de l'α aminoadipate. Les conclusions de cette étude sont résumées ci-dessous :

- Le système de transport de l'αAA est complètement inhibé par l'azoture de sodium 2 mM (voir fig 18a) et saturable (fig.19) : il présente les caractéristiques d'un système de transport actif, à faible affinité pour l'αAA ($S_{0,5} \simeq 0,2$ mM).
- L'optimum de pH du système est situé vers pH 3,0 (fig.18b)
- Le transport de l'αAA est inhibé compétitivement par les acides aminés neutres et acides testés, (sérine, valine, glutamate, aspartate) - voir fig.20 - ce qui permet de supposer que l'αAA pénètre dans les cellules par une "perméase commune" à ces composés. Aux concentrations testées (1 mM), on n'observe aucune inhibition du transport de l'αAA en milieu N5000 par la lysine, le pipécolate, le dipicolinate ou l'arginine. Sur MMN_0ProN, l'entrée de l'αAA est insensible à ces composés et à l'ammonium. Réciproquement on sait que chez *S. livolytica* le transport de la lysine n'est pas affecté par l'αAA (J.M.Beckerich 1975).
- On a cherché à observer soit une "transinhibition" de l'entrée de l'αAA par le pool de lysine interne (Hunter et Segel 1971), soit une répression de l'entrée dans des souches cultivées sur lysine (Joiris et Grensen 1969). On n'en a pas trouvé (voir tableau ci-dessous).

../..

Fig; 18. Linéarité de l'incorporation de l'αaminoadipate et effet du pH.



Conditions expérimentales 100 µM $\alpha AA^{14}C$ souche W29 cultivée sur N5000.

a) En haut: linéarité en fonction du temps à pH 3,0 (○), pH 5,0 (●), et à pH 3,0 en présence d'azoture de sodium 2 mM (△).

b) En bas: effet du pH (tampon TRIS-citrate 0,1 M) sur l'incorporation. 2 min.

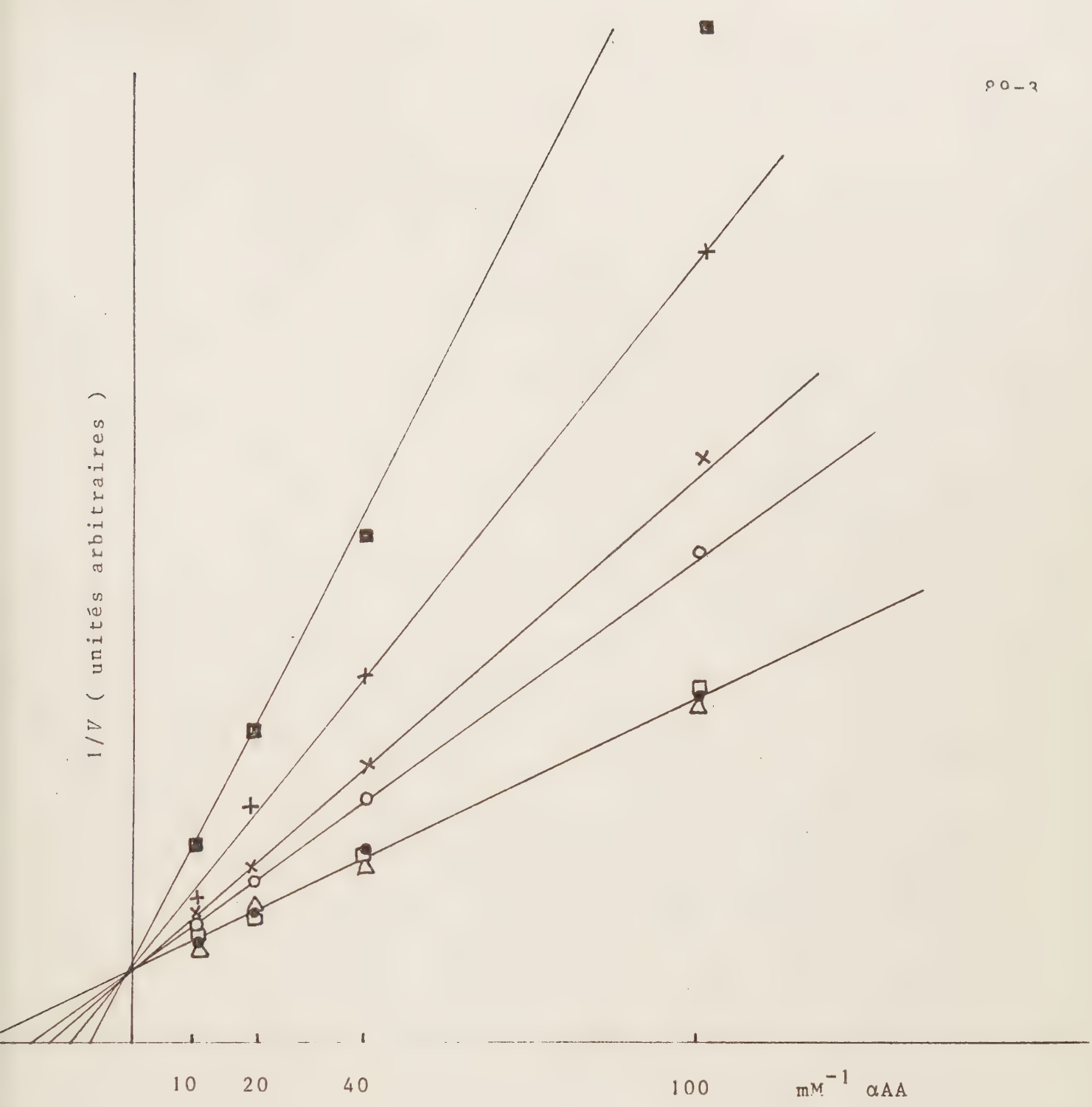


Fig.19 Inhibiteurs de l'incorporation de l'αAA.

Souche W29 cultivée sur $^{MM}N_o^{Pro}N$. On a mesuré l'incorporation sur 1 min en présence des composés suivants: glutamate (■) 0,1 mM: aspartate (+) 0,1 mM; sérine (×) 0,2 mM; valine (○) 0,2 mM; pipécolate (□) 1 mM; lysine (△) 1mM. Témoin: (●).

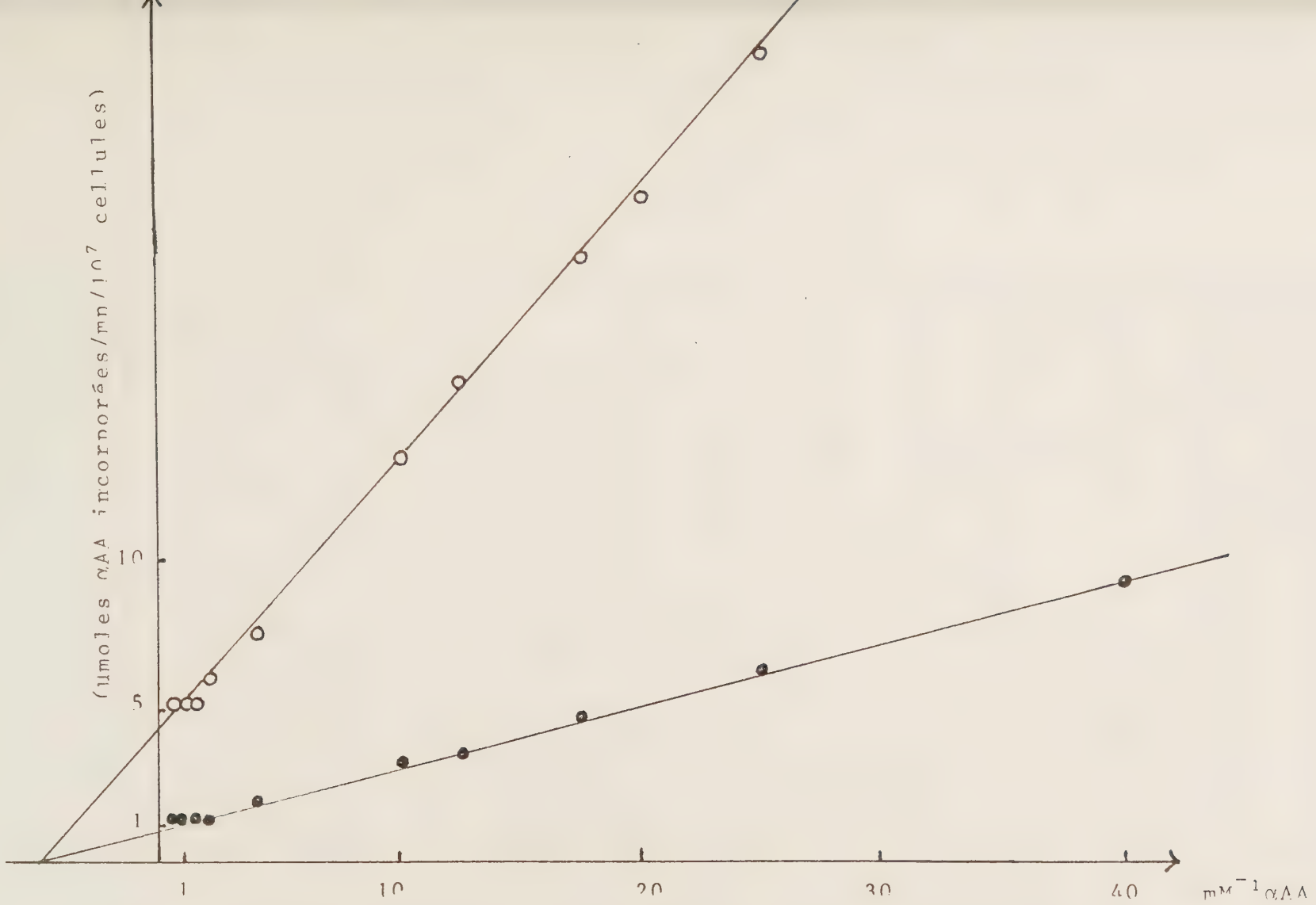


Fig. 20. Saturation du système de transport de l' αAA (pH 3,0).

Souches cultivées en MMN5000 (○) et en MMN_o ProN (●). H 29.

Effet de la charge en lysine sur le transport de l'αAA par la souche W29

Conditions de culture (pH 3,0)	nmoles αAA accumulées par 10^6 cellules (3)
6h.sur N5000 + 2 mM lysine (1)	1,88
6h.sur N5000 (2)	1,87
6h.sur N5000 + 30 min.sur N5000 + 2 mM lysine	1,84
6h.sur N5000 + 1h.sur N5000 + 2 mM lysine	1,75
6h.sur N5000 + 2h.sur N5000 + 2 mM lysine	1,92

(1) La préculture a été effectuée une nuit sur N5000 + 2 mM lysine

(2) Préculture sur N5000, culture de 6h. sur N5000, puis on ajoute 2 mM lysine (concentration finale) à la culture. Le pool de lysine est maximum au bout de 1 h. (J.M.Beckerich, pers. Commun.) Des aliquots de la culture sont filtrés et lavés par N5000 avant de mesurer le transport.

(3) Mesure sur N5000

- L'incorporation de l'αAA est par contre diminuée (facteur 4 ≃) si les cellules sont cultivées sur MM N5000 par rapport aux témoins cultivés sur N_oProN. Il n'y a pas modification du K_m apparent du système dans ces conditions (foir fig.19).

De l'ensemble de ces résultats, on peut déduire que chez *S. lipolytica* l'αAA est essentiellement transporté par une perméase de type général, peut être réprimée par l'ammonium comme l'est celle de *S. cerevisiae* (Grenson 1966). Il est important de noter que le transport de l'αAA n'est pas affecté par la lysine dans les conditions testées: chez

..|..

S. cerevisiae, il est inhibé et réprimé par la lysine, et s'effectue surtout par une perméase spécifique des acides aminés dicarboxyliques insensible aux acides aminés neutres (Joiris et Grenson 1969).

On a testé tous les mutants lys⁻ sur MM N5000 et MM N_oProN supplémentés en αAA (100 mg/l) à pH 3,0; les milieux solides sont amenés à ce pH après autoclavage par addition d'un tampon phtalate HCl 0,1 M). La croissance des mutants précoces sur ces deux milieux est rapide, les seules souches qui ne poussent pas sont celles qui sont bloquées dans la 2ème partie de la voie (voir B, c) ci-après).

Nous n'avons pas pu étudier le système de transport(s'il existe) de l'α cétoadipate, ce composé n'étant pas commercialisé sous forme marquée. Certains mutants précoces sont capables d'utiliser ce composé au lieu de la lysine, mais les réponses ne sont pas reproductibles, quel que soit le pH ou la source d'azote utilisée. L'α KA 1 mM n'est pas inhibiteur du transport de l'αAA ou de la lysine.

La saccharopine ne permet pas une croissance significative des mutants lys⁻; tous poussent lentement sur ce composé, y compris lys12 qui ne le devrait pas (SDH⁻, voir B, c)). Il est probable que ce composé est partiellement hydrolysé en lysine par nos souches, on l'a par ailleurs trouvé instable en pH acide (libération de lysine quand on essaie de le chromatographier avec un solvant acide).

c) Etude des produits d'accumulation

Comme il n'existe pas de méthode chromatographique simple et sensible pour détecter les acides tricarboxyliques, ce type d'étude a surtout concerné les mutants de la 2ème partie de la voie, incapables de pousser sur α aminoadipate. Les principaux produits caractérisés sont rassemblés dans le tableau 25. La présence d'αaminoadipate a été vérifiée par chromatographie sur colonne (voir fig.21).

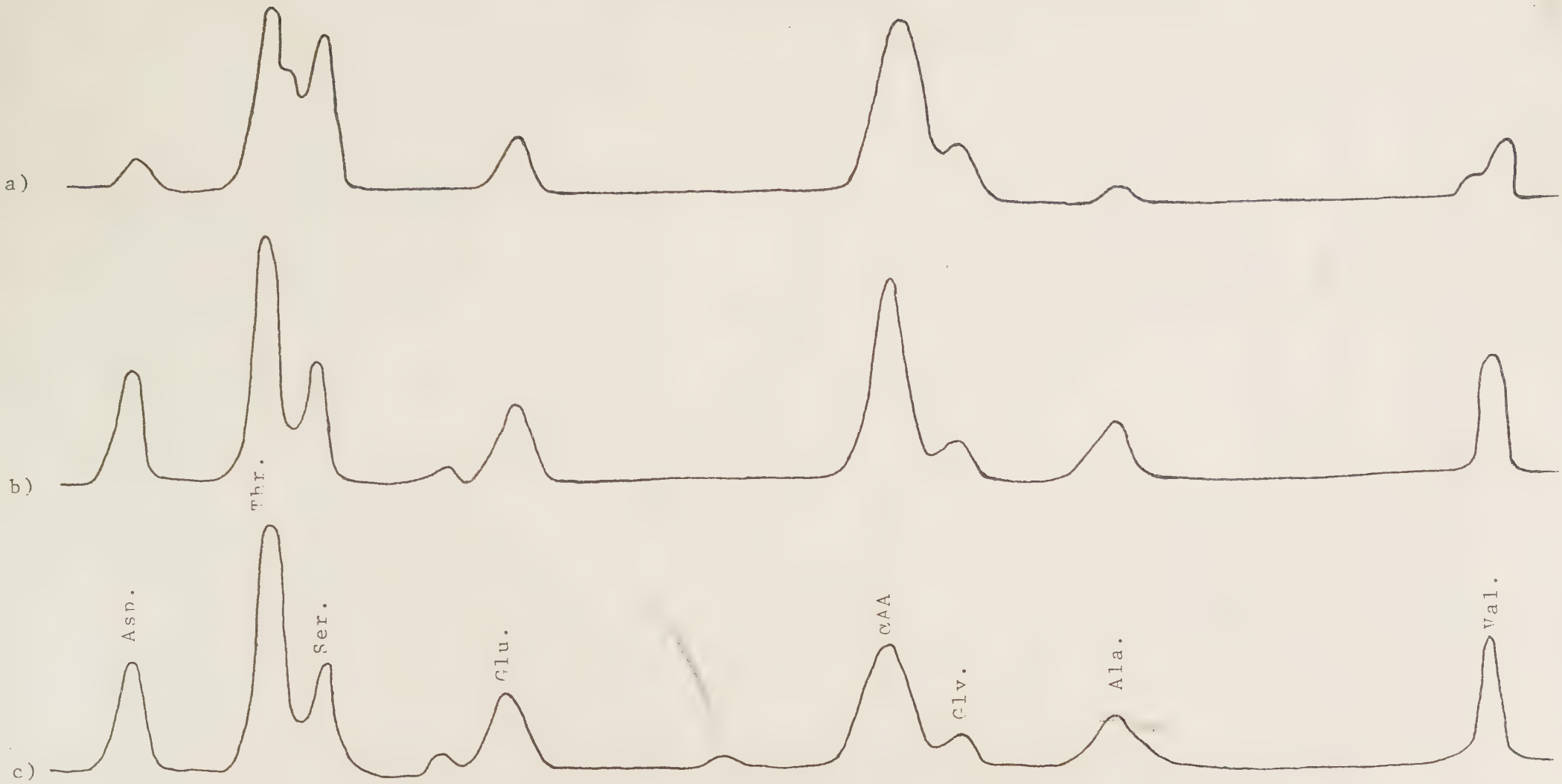


Fig. 21. Analyse chromatographique des "pools" d'acides aminés des mutants AAP⁻

Cultures stationnaires sur M5000 + 1 mM lysine. Analyseur d'acides aminés.
a): lys12 b): lys 5 (renforcé en αAA) c) lys 5.

Tableau 25 - Principaux produits d'accumulation des souches "tardives"

48 h. de culture sur N5000 + lysine $3,5.10^{-4}$M

Souches	Génotypes	Surnageant (concentré 10 x)	Pool intracellulaire
9401-1 lys15 lys18 lys20 6-22	(lys2.5) (lys2.15) (lys3.18) (lys3.20) (ly s3.12A)	Glu Thr Adénosine	α AA, Glu, Thr Adénine, Adénosine (Asp, AMP)
8701-3 lys9	(lys4.14B) ?	Glu	Glu (αAA)
6-15	(lys5.12B)	Saccharopine, Glu	Saccharopine, Glu
8701-5 W29	(lys3.14A)	Glu	Glu

On observe qualitativement 4 types de mutants selon qu'ils accumulent des traces d'αaminoadipate, de l'α aminoadipate + thréonine + adénosine + adénine, de la saccharopine, ou qu'ils ne se distinguent pas de W29. On note qu'on n'a pas décelé l'accumulation d'un composé adénylé non identifiable, susceptible de correspondre au dérivé adénylé de l'aminoadipate décrit par Mattoon et al (1961) : seules l'adénosine, l'adénine et l'AMP sont accumulés par certaines souches.

B. Caractérisation génétique et biochimique des mutants

a) Test de complémentation fonctionnelle

On a testé en confrontation la plupart des combinaisons de mutants isolés. Pour limiter le nombre de croisements à réaliser, on s'est servi de la classification établie précé-

../..

demment en souches utilisatrices et souches non utilisatrices d'α aminoadipate. Le test de complémentation a d'abord été conduit à l'intérieur de chacun de ces groupes.

Pour chaque combinaison de deux marqueurs, on a utilisé entre 4 et 20 sous-clones provenant du premier croisement du mutant de départ : dans certains cas, en effet, le résultat dépendait du sous-clone choisi. Deux principales causes de variabilité ont été rencontrées : existence de suppresseurs extragéniques non liés apportés par une souche, existence de souches portant deux mutations de la voie de biosynthèse. Seul le dernier cas est intéressant ici : les souches lys12 et lys14 isolées sont en fait des doubles mutants, et on a distingué dans le tableau récapitulatif 26 les 4 types lys12A, lys12B, lys14A et lys14B.

On constate l'existence de 7 groupes de complémentation dans le tableau 26A. 5 ne sont représentés que par un seul mutant : lys2, lys11, lys17, lys22 et lys23 qui complémente avec toutes les autres souches. Les deux mutations présentes dans lys3 et lys19 ne complémentent pas entre elles, mais complémentent avec toutes les autres. Reste un groupe majoritaire (8 mutants sur 15) qui complémente avec les mutants précédents et présente des relations de complémentation interne complexe.

On trouve 4 groupes de complémentation dans le tableau 26B; il n'y a pas de groupe complexe.

On constate enfin sur le tableau 26C que rien ne permet de supposer un recouvrement des groupes de complémentation définis dans 27A et 27B. Les mutants étudiés se répartissent donc en 11 groupes de complémentation.

../..

Table 26 - Tests de complémentation des mutants lys⁻ isolés (désignés par leur numéro d'ordre).

A. Mutants utilisant l'α aminoadipate

	lys1	lys2	lys3	lys4	lys7	lys8	lys10	lys11	lys13	lys16	lys17	lys19	lys21	lys22	lys23
ys23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ys22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
ys21	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-		
ys19	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-			
ys17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
ys16	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-					
ys13	-	+	+	-	+/-	-	-	+	-						
ys11	+	+	+	+	+	+	+	-							
ys10	+	+	+	-	+	-	-								
ys8	+	+	+	-	-	-									
ys7	+	+	+	+/-	-										
ys4	+	+	+	-											
ys3	+	+	-												
ys2	+	-													
ys1	-														

B. Mutants n'utilisant pas l'α aminoadipate

	lys5	lys12A	lys12B	lys14A	lys14B	lys15	lys18	lys20
lys20	+	-	+	-	+	+	-	-
lys18	+	-	+	-	+	+	-	
lys15	-	+	+	+	+	-		
lys14B	+	+	+	+	-			
lys14A	+	-	+	-				
lys12B	+	+	-					
lys12A	+	-						
lys5	-							

C. Groupes de complémentation

	1								6		7	8	9	10	11
	lys1	lys4	lys7	lys8	lys10	lys13	lys16	lys21	lys3	lys19	lys2	lys11	lys17	lys22	lys23
lys5	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+
lys15	+	+	+	+		+		+	+	+	+		+		+
lys12A	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+
lys14A	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+
lys18	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+			+	+
lys20	+	+	+	+	+	+	+				+				+
lys12B	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lys14B	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

b) Liaison des marqueurs lys⁻

On n'a réalisé que 32 des 45 types de confrontation inter groupes de complémentation (voir tableau 27) , mais il ne semble pas qu'il y ait d'organisation type opéron bactérien. On remarque cependant que les marqueurs des groupes de complémentation 2 et 3 sont fortement liés, de sorte que la distinction des loci (lys2.) et (lys3.) est peut-être arbitraire. Par ailleurs, tous les mutants du groupe de complémentation 1 sont très fortement liés et correspondent vraisemblablement à un locus unique (lys1.).

c) Etude enzymologique des mutants

On a mesuré sur la plupart de ces mutants les activités qu'on savait doser, c'est-à-dire l'homocitrate synthétase, le système aminoadipyl réductase, la glutamate semialdéhyde aminoadipyl réductase et la saccharopine déshydrogénase. La plupart des dosages ont été effectués sur les souches mutantes isolées, de sorte que certaines variations d'activité spécifique peuvent être dûes à autre chose qu'aux mutations étudiées. On a fait une exception à cette règle dans le tableau 28 pour les souches lys12 (lys3.12A, lys5.12B) et lys14 (lys3.14A, lys4.14B) parce que :

- elles sont digéniques
- l'une des mutations (lys3.) affecte l'homocitrate synthétase.

On constate que :

- tous les mutants du locus (lys1.) sont affectés dans l'homocitrate synthétase, ainsi que le mutant lys23 qui est indépendant (locus (lys11.))

- tous les mutants des loci (lys2.) et (lys3.) qui sont indiscernables par test de recombinaison sont affectés dans l'aminoadipate réductase et présentent une activité homocitrate synthétase trois fois plus élevée que celle du sauvage.

Les autres mutations sont sans effet sur ces deux activités. Nous allons étudier plus en détail les mutations des loci (lys1.), (lys2.) et (lys3.).

../..

Tableau 27 - Liaison des marqueurs lys- (voir légende page suivante)

	lys1.1	lys1.4	lys1.7	lys1.10	lys1.13	lys2.5	lys2.15	lys3.12A	lys3.14A	lys4.12B	lys5.14B	lys6.3	lys6.19	lys7.2	lys8.11	lys9.17	lys10.22	lys11
lys11.23								17/72		74/293								
lys10.22					39/148		43/200					45/200						
lys9.17					27/118		49/200					38/200						
lys8.11					42/159			45/176		44/200		24/89						
lys7.2			34/131		19/61			29/118		54/211		83/318						
lys6.19	84/329											0/854						
lys6.3					76/295			54/593	62/675	28/127	39/156		< 1%	50%	50%	50%	50%	
lys5.14B					39/156	43/159		37/152		45/162		50%		50%**	50%**	50%**	50%**	50
lys4.12B					22/78	54/216		45/172			50%	≃ 50%		50%	50%			50
lys3.14A					87/355			2/1216										
lys3.12A	59/231		63/236		76/278	12/1537	14/1326											
lys2.15					42/158	0/876		< 2%		50%	50%	≃ 18%		50%	50%	50%	50%	50
lys2.5					106/398													
lys1.13	0/512	0/487	1/679	0/475														
lys1.10	0/437	0/415	0/536															
lys1.7	2/506	0/510	< 1%					50%		50%	50%	50%		50%	50%	50%	50%	50
lys1.4	1/145																	
lys1.1																		

Tableau 28 - Activités enzymatiques des souches lys⁻

Loci	Souches	HS Δdo/mg /prot/min	AAR (1) nmoles $NADPH_2$/min/mg	AAR (2) Δ do/ mg prot/min	AASAGR nmoles NADP mg prot/min	SDH nmoles NAD/ mg prot/min
lys1.	lys1	≤ 0,001			20	372
lys7	lys2	0,033	10	0,030	20	368
lys6.	lys3	0,030	10	0,028	20	380
lys1.	lys4	≤ 0,001	10	0,031	19,5	390
lys2.	lys5	0,096	0	0	19	380
lys1.	lys7	≤ 0,001	10	0,030		
lys1.	lys8	≤ 0,001				
?	lys9	0,030	9,5	0,027	0	380
lys1.	lys10	≤ 0,001			20	
lys8.	lys11	0,031	10,5	0,031	19	400
lys3.	9203-4 (lys3.12A)	0,092	0	0	20	375
lys4.	2-18 (lys4.12B)	0,030	10		20	0
lys3.	4304-7 (lys3.14A)	0,095	1,5	0,004	20	363
lys5.	4304-1 (lys5.14B)	0,029	10		0	382
lys2.	lys15	0,093	0	0	19	350
lys1.	lys16	≤ 0,001	10,5	0,031	17	410
lys9.	lys17	0,032	11	0,033	19	350
lys3.	lys18	0,099	0	0	17,5	394
lys6.	lys19	0,037	10	0,030	20	390
lys3.	lys20	0,090	0	0	15	348
lys1.	lys21	≤ 0,001			17	368
lys10	lys22	0,030	10,5	0,032	20	376
lys11	lys23	≤ 0,001	10		20	395
	W29	0,030	10	0,030	20	368

AAR (1) : Oxydation du $NADPH_2$ AAR (2) : Méthode au pDMABA

Légende de la page 96. -

Dans la partie supérieure du tableau,on a indiqué pour chaque croisement testé, le nombre de prototrophes lys^+ apparus sur le nombre de colonies testées.
Dans la partie inférieure droite, on a indiqué les pourcentages de recombinaison approchés

\+ Croisé par (lys1.5)

++ (lys5.14B) est très lié à (his1.) qui est indépendant de (lys7.),(lys8.),(lys9.) (lys10.) et (lys11.)

C. Etude génétique des mutants du locus (lys1.)

Ces mutants ont tous été caractérisés comme ayant perdu l'activité du premier enzyme de la voie de biosynthèse. L'étude génétique de ces mutants, qui n'ont pas été obtenus chez *S.cerevisiae* devait par ailleurs préciser les conditions de la complémentation décrite plus haut. Il était en effet possible a priori qu'il ne s'agisse pas de complémentation intragénique vraie (impliquant l'existence de sous-unités identiques, Crick et Orgel 1964) mais d'une complémentation entre loci liés (comme c'est peut-être le cas pour les loci (lys2.) et (lys3.) -voir plus bas -.

a) Suppression phénotypique et réversibilité des mutants du locus (lys1.)

On considère généralement (Korch et Snow 1973) que les mutants de type "faux sens" sont plus généralement sensibles à des variations des conditions de croissance que les mutants de type "non sens", délétion, déplacement du cadre de lecture, etc... L'étude des conditions de suppression phénotypique peut donc, dans certains cas, permettre une première caractérisation des mutations étudiées.

On a rassemblé dans le tableau 29 les résultats des tests de sensibilité à la température et à la pression osmotique. Pour cela chaque mutant a été étalé sur YE et répliqué sur MM (pH non ajusté, ≃ pH 5,5) et sur MM pH 5,0 contenant 1 M KCl en trois exemplaires. Les boîtes sont alors incubées à 10°, 32° et à la température de la pièce (20-25°C). On a également testé la croissance sur YE à 32° quand on s'est rendu compte que lys1 ne poussait pas dans ces conditions.

On constate que la plupart des mutants sont "leaky" à basse température et que ce phénotype est renforcé par une pression osmotique élevée : Par ailleurs, ils réversent tous sauf (lys1.13) spontanément ou après irradiation aux UV. Le cas de (lys1.13) reste par ailleurs douteux: on n'a pas obtenu une seule réversion sur environ 10^9 cellules traitées ou non

../..

par les UV, mais des réversions peuvent être obtenues dans d'autres conditions (J.M. Beckerich, Comm. Pers.). Il semble donc que la plupart des mutations sélectionnées jusqu'ici soient des faux sens, ce qui est partiellement confirmé par les études de complémentation. Ce phénomène peut être dû au petit nombre d'allèles testés (chez *S. cerevisiae*, 1/3 des mutants isolés environ sont des non-sens (Mortimer and Gilmore 1968). Le fait cependant que certains allèles comme (lys1.1) et (lys1.16) soient partiellement ou complètement "température sensibles" sur YE pourrait indiquer que le gène (lys1.) a une autre fonction, non impliquée dans la biosynthèse de la lysine ou non compensable par la lysine (voir Korch et Snow 1971, pour une situation analogue). L'étude de nouveaux mutants (lys1.) serait donc utile. Schlessinger (1974) a suggéré que le seul critère sûr de la non-nécessité d'un gène soit l'obtention de délétions ou de modifications du cadre de lecture.

Tableau 29 - Caractérisation des mutants du locus (lys1

	YE	MM (1)			MM+KCl 1M (1)			Réversibilité (2)	
	32°C	10°	≃ 20°	32°	10°	≃20°	32°	spontanée	UV
lys1 *	- *	+/-	-	-	+/-	+/-	-	$60/4.10^8$	+
lys4	+	+/-	-	-	+/-	+/-	-	$374/3.10^8$	+
lys7	+	-	-	-	+/-	-	-	$14/4.10^8$	+
lys8	+	+/-	-	-	+/-	+/-	-	$487/3.10^8$	+
lys10	+	+/-	-	-	+/-	-	-	$3432/4.10^8$	+
lys13	+	-	-	-	-	-	-	$0/6.10^8$	- ?
lys16*	+/-*	-	-	-	+/-	-	-	$72/4.10^8$	+
lys21	+	-	-	-	+/-	-	-	$4/4.10^8$	+

(1) Lectures après 1 semaine

(2) On a étalé 10 boîtes avec 10^7 cellules/boîtes. Après irradiation UV, les réversions apparaissent progressivement au cours du temps rendant un comptage impossible.

* 15 souches testées.

../..

b) Test de complémentation fonctionnelle

1). Les résultats d'un tel test sont présentés dans les tableaux 30 et 31. On a noté"+"une croissance du diploïde aussi rapide sur MM que sur MM + lys,"-" une croissance nulle ou un lag supérieur à 5 jours, et"±" les réponses intermédiaires. Dans les cas où quelques colonies seulement se développaient sur un fond - ou +/- homogène, on en a noté le nombre sans en tenir compte pour l'établissement du tableau. L'existence de résultats discordants (c'est-à-dire"+"par exemple quand l'ensemble des confrontations impliquant les mêmes allèles donnait "-") nous a amenés à réaliser pour chaque couple d'allèle une dizaine de confrontations au moins avec des souches issues de différents diploïdes parentaux.

On constate que tous les allèles obtenus, y compris (lys1.13), complémentent avec au moins un autre allèle: il n'y a pas a priori de délétion dans les mutants testés

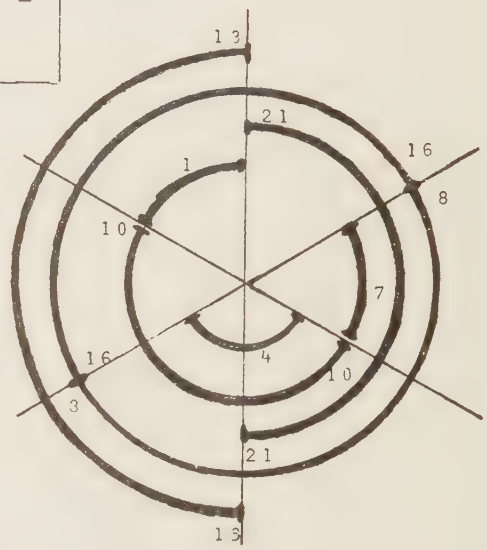
Les 8 mutants correspondent à 8 groupes de complémentation définissant 6 unités sur une carte circulaire. L'existence d'une carte circulaire n'a rien de surprenant, si ce n'est le petit nombre de mutants qui a suffi à l'établir : jusque vers 30-50 mutants complémentant testés, les cartes sont généralement linéaires (O.J.Gillie 1966) mais 11 mutants du gène rII A de T4 ont suffi à établir une carte circulaire (Champe 1965, cité par Gillie 1966). L'absence de groupe de complémentation comprenant plus d'un mutant est sans doute un effet d'échantillonnage et semble signifier qu'il en existe beaucoup plus.

2). La validité des résultats ci-dessus dépend bien sûr de ce que sont réellement les clones prototrophes dits "complémentant". Par ailleurs, l'existence de "réversions" et de résultats "discordants" nous a amenés à tester la présence des marqueurs de départ dans la descendance des

../..

Tableau 30 - Complémentation dans le locus (lys1.)
Croissance des diploïdes sur MM N5000 (1)

	lys1.1	lys1.4	lys1.7	lys1.8	lys1.10	lys1.13	lys1.16	lys1.21
lys1.21	12 + (o)	16 - (4 +)	11 - o	16 - o	14 - (1 +)	18 + o	16 - o	8 - o
lys1.16	8 - (o) +)	16 + o	14 + o	10 + o	16 - o	16 - o	7 - o	
lys1.13	22 - (o +)	9 - (o +)	15 +/- 2 -	12 - 3 +/-	24 -	8 - o		
lys1.10	15 + (o)	14 - (4 +)	13 + 7 +/-	15 - o	10 - o			
lys1.8	15 + (o)	13 - (4 +)	21 - (5 +/-	11 - o				
lys1.7	11 + (o)	30 +/- (2 +)	14 - o +					
lys1.4	13 + (o)	8 - (o)						
lys1.1	9 - (o)							



(1) On a indiqué pour chaque croisement le nombre de confrontations différentes ayant donné le résultat indiqué (ligne supérieure) et le nombre de confrontations aberrantes (ligne inférieure).

Pour la carte, on a considéré que les résultats notés +/- correspondaient à une complémentation : dans le tableau 31, on voit que les diploïdes correspondants ont environ 50% de l'activité des diploïdes +; et environ 10 fois plus que les diploïdes -.

Tableau 31 - Complémentation dans le locus (lys1.)

Complémentation : test in vitro des extraits des diploïdes (lys1./lys1.)

Phénotype	Diploïdes	Activité spécifique
+	(+/+)	0,037
	(lys1./lys1.10)	0,021
	(lys1.1/lys1.8)	0,022
	(lys1.1/lys1.7)	0,021
	(lys1.1/lys1.4)	0,029
	(lys1.7/lys1.10)	0,020
+/-	(lys1.4/lys1.7)	0,013
	(lys1.7/lys1.13)	0,012
-	(lys1.1/lys1.13)	0,0010
	(lys1.4/lys1.13)	0,0010
	(lys1.4/lys1.10)	0,0007
	(lys1.4/lys1.8)	0,0010
	(lys1.7/lys1.8)	0,0010
	(lys1.8/lys1.13)	0,0006
	(lys1.8/lys1.10)	0,0008
	(lys1.10/lys1.13)	0,0009
	(lys1.1/lys1.1)	0,0016
	(lys1.4/lys1.4)	0,0011
	(lys1.7/lys1.7)	0,0017
	(lys1.8/lys1.8)	?
	(lys1.10/lys1.10)	0,0013
	(lys1.13/lys1.13)	0,0014

../..

diploïdes prototrophes. Ces derniers peuvent avoir plusieurs origines :

1. Complémentation vraie, et les deux marqueurs testés doivent exister en répulsion dans la souche. On pourra le confirmer en vérifiant que la descendance de ces souches est composée pour plus de 99% par des souches lys^- et que celles-ci donnent en complémentation les mêmes résultats que les souches haploïdes parentales.

2. Suppression d'un des deux marqueurs : si le suppresseur est allèle spécifique et apporté par l'autre souche, on trouvera 3 lys^- : 1 lys^+ dans la descendance (si le suppresseur n'est pas lié à (lys1.)).

3. Conversion ou recombinaison mitotique : on doit trouver 1 lys^+ : 1 lys^- dans la descendance. Les souches lys^- seront dans un cas sur deux des doubles mutants s'il y a eu recombinaison, elles correspondront à l'un des deux marqueurs dans les autres cas. On les déterminera par complémentation comme dans le cas 1.

Il faut noter qu'aucun des résultats discordants n'est apparu comme résultant de la germination d'une spore recombinée : toutes les souches brunissent sur V8 et sont donc bien diploïdes .

- Diploïdes résultant d'une complémentation

Pour chacune des 13 confrontations du tableau 30 notées + ou +/- , on a testé la descendance d'un diploïde au moins Dans tous les cas, on a trouvé moins de 1% de descendants lys^+. 10 souches lys^- ont été purifiées pour chaque diploïd et confrontées à 8 souches testrices porteuses des 8 allèle

../..

(lys1.) étudiés : dans tous les cas on a trouvé au moins un descendant de chacun des types parentaux, ce qui permet d'affirmer que dans tous les diploïdes prototrophes testés les deux allèles supposés existaient en répulsion (voir tableau 32). Il faut cependant noter qu'on n'a pas exclu par ce test la possibilité qu'une des souches mères ait été porteuse d'un suppresseur dominant très lié.

Tableau 32 - Existence des marqueurs initiaux dans les diploïdes complémentant

Génotype du diploïde de départ (lys a/lys b)	Réapparition des souches parentales	
	lys a	lys b
(lys1.1/lys1.4)	7	3
(lys1.1/lys1.7)	3	5 (1)
(lys1.1/lys1.8)	5	5
(lys1.1/lys1.10)	6	3 (1)
(lys1.1/lys1.21)	4	6
(lys1.4/lys1.7)	9	1
(lys1.4/lys1.16)	4	6
(lys1.7/lys1.8)	5	3
(lys1.7/lys1.10)	5	4
(lys1.7/lys1.13)	6	4
(lys1.16/lys1.7)	8	2
(lys1.16/lys1.8)	4	6
(lys1.13/lys1.21)	3	7

(1) Certaines souches ne se sont pas croisées partout

- Cas des confrontations avec 9301-7 (lys1.4, ade1, x)

Les diploïdes (lys1.4/lys1.10) et (lys1.4/lys1.8) formés à partir du parent 9301-7 phénotypiquement lys^-ade^- sont tous prototrophes quelle que soit la souche (lys1.10) ou (lys1.8) utilisée.

La descendance des quatre diploïdes résultant d'une telle confrontation 9301-7 x (lys1.10) ou 9301-7 x (lys1.8) a été analysée : on y trouve un grand nombre de lys^+ (voir tableau 33A), ce qui suggère l'idée d'un suppresseur. 4 souches lys^+ notées I, II, III et IV de phénotypes respectifs lys^+his^-, lys^+ade^-, lys^+ade^- et lys^+his^- ont été isolées et purifiées, puis croisées par une souche de référence (ura2.). La descendance des diploïdes résultants a été analysée (tableau 33B): on voit que dans tous les cas, 1/4 des descendants environ sont lys^-. Le marqueur lys^- masqué dans les souches I, II, III et IV, a été déterminé par complémentation : il s'agit toujours soit de (lys1.8) soit de (lys1.10) suivant le diploïde d'origine (tableau 33B).

On en déduit que I, II, III et IV portaient soit(lys1.8)soit(lys1.1 et un suppresseur vraisemblablement apporté par 9301-7. En croisant I (A, his1, lys1.8, x) par 5202-7 (B, lys1.10, pyr1) on peut montrer que c'est le même suppresseur qui fonctionne dans les deux cas : sur 432 colonies analysées dans la descendance, 227 sont lys^+ et 20 sont lys^-. Ce suppresseur dominant est par ailleurs spécifique : l'utilisation de 9301-7 n'affecte pas le phénotype des diploïdes (lys1.4/lys1.13), (lys1.4/lys1.21).

L'origine du suppresseur présent dans 9301-7 reste incertaine : sur 6 descendants lys^-ade^- du diploïde 9301- utilisés dans les tests de complémentation, seul 9301-7 semble porter x : il pourrait s'agir soit d'une erreur à la méiose soit d'un reste d'anisogénie des souches.

../..

Un travail identique a permis de caractériser de façon préliminaire des suppresseurs de (lys1.1), (lys1.21) et (lys1.16) : tous sont spécifiques de l'allèle muté.

Tableau 33 - Etude des diploïdes prototrophes (lys1.4/lys1.8) et (lys1.4/lys1.10) faisant intervenir 9301.7 (lys1.4, ade1, x).

A. Analyse des diploïdes prototrophes

Croisements	Génotypes connus	Nb total de colonies testées	Colonies lys^+ (1)	ade^-lys^+ / $10 lys^+$ (2)	his^-lys^+ / $10 lys^+$ (2)
8501-12x9301-7	(B,lys1.8,his1.,+/A;lys1.4,+,ade1)	128	44	2	3(→I)
9501-9 x9301-7	(B,lys1.8,his1.,+/A,lys1.4,+,ade1)	100	33	2(→II)	3
108-1 x9301-7	(B,lys1.8,ura1.,+/A,lys1.4,+,ade1)	154	46		
108-2 x9301-7	(B,lys1.8,ura1.,+/A,lys1.4,+,ade1)	77	16		
5202-7 x9301-7	(B,lys1.10,ura3.,+/A,lys1.4,+,ade1)	70	17		
5202-8 x9301-7	(B,lys1.10,ura3.,+/A,lys1.4,+,ade1)	127	33	1(→III)	0
9601-7 x9301-7	(B,lys1.10,his1.,+/A,lys1.4,+,ade1)	202	69	3	2(→IV)
9601-8 x9301-7	(B,lys1.10,his1.,+/A,lys1.4,+,ade1)	59	13		

(1) Réplique sur milieu sans lysine supplémenté pour les autres besoins.

(2) Nombre de clones ade^- (ou his^-) sur 10 clones lys^+ testés. On a indiqué entre parenthèses l'origine des souches I, II , III et IV utilisées ci-dessous.

B. Etude des souches I, II, III et IV

Croisements	lys^+	lys^-	Nature de 4 clones lys^- (1)
I x 105-1 (B, ura2.)	786	238	(lys1.8)
II x 105-1 (B, ura2.)	188	52	(lys1.8)
III x 105-9 (A, ura2.)	345	124	(lys1.10)
IV x 105-9 (A, ura2.)	257	89	(lys1.10)

(1) Déterminée par complémentation

- Etude de quelques "réversions"

Elles apparaissent chez certains diploïdes hétéroalléliques sous forme de colonies prototrophes sur un fond homogène de cellules diploïdes lys⁻. Leur nombre s'accroit progressivement au cours du temps pour dépasser $500/10^7$ cellules étalées au bout de 10 jours. Au même moment, on compte selon les souches une centaine de réversions au plus dans le cas de diploïdes homozygotes, et au moins 10 fois moins dans les haploïdes de départ.

Toutes les réversions testées (≃ 200) sont diploïdes (brunes sur V8) On peut a priori envisager 3 mécanismes différents pour expliquer ce taux élevé de réversion, si on néglige la réversion vraie ou l'apparition de suppresseurs intragéniques qui ne doivent guère être affectés par l'état diploïde : suppression extragénique dominante, conversion d'un des marqueurs, crossing over mitotique. Dans ce dernier cas, la moitié des diploïdes prototrophes doivent porter en cis une double mutation (lys1.) C'est dans l'espoir d'obtenir ces doubles mutants qu'on a analysé un certain nombre de réversion (voir tableau 34).

Après sporulation, toutes les réversions ségrègent 1 lys⁺:1 lys⁻ ce qui exclut l'existence de suppresseurs non liés. On a essayé de déterminer par complémentation quels allèles étaient présents dans les diploïdes révertants (6 descendants lys⁻ par diploïde testé). On n'a pas trouvé autre chose que les marqueurs parentaux : il est probable que la majeure partie des "réversions" résultent des conversions (ou de suppressions intragéniques ?)

c) Liaison des marqueurs (lys1.)

Les résultats des analyses de sporées en masse des diploïdes sont rassemblés dans le tableau 35. On a négligé un certain nombre de diploïdes donnant des réponses aberrantes (forte proportion de lys⁺) et qui sont le résultat probable d'un

../..

Tableau 34 - Recherche de doubles mutants (lys1.)

Diploïdes de départ	Ségrégations lys$^+$	Ségrégations lys$^-$	Nature du marqueur lys$^-$	Structure supposée du diploïde révertant
(lys1.1/lys1.13)	66	49	(lys1.13)	$\frac{13}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.1/lys1.13)	85	83	(lys1.13)	$\frac{13}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.1/lys1.13)	103	89	(lys1.1)	$\frac{+}{+}\;\frac{1}{+}$
(lys1.1/lys1.13)	86	67	(lys1.13)	$\frac{13}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.1/lys1.13)	82	78	(lys1.1)	$\frac{+}{+}\;\frac{1}{+}$
(lys1.4/lys1.8)	57	43	(lys1.4)	$\frac{4}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.4/lys1.8)	96	62	(lys1.4)	$\frac{4}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.4/lys1.8)	82	68	(lys1.8)	$\frac{+}{+}\;\frac{8}{+}$
(lys1.4/lys1.8)	63	59	(lys1.4)	$\frac{4}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.7/lys1.8)	75	66	(lys1.7)	$\frac{+}{+}\;\frac{7}{+}$
(lys1.7/lys1.8)	85	74	(lys1.8)	$\frac{8}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.7/lys1.8)	78	69	(lys1.7)	$\frac{+}{+}\;\frac{7}{+}$
(lys1.7/lys1.8)	95	93	(lys1.7)	$\frac{+}{+}\;\frac{7}{+}$
(lys1.4/lys1.10)	70	66	(lys1.4)	$\frac{4}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.4/lys1.10)	29	32	(lys1.4)	$\frac{4}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.4/lys1.10)	82	88	(lys1.10)	$\frac{+}{+}\;\frac{10}{+}$
(lys1.4/lys1.10)	66	58	(lys1.4)	$\frac{4}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.7/lys1.13)	86	74	(lys1.13)	$\frac{13}{+}\;\frac{+}{+}$
(lys1.7/lys1.13)	51	49	(lys1.7)	$\frac{+}{+}\;\frac{7}{+}$
(lys1.1/lys1.16)	74	69	(lys1.16)	$\frac{16}{+}$
(lyq1.1/lys1.16)	44	39	(lys1.16)	$\frac{16}{+}\;\frac{+}{+}$

Tableau 35 - Fréquence d'apparition de recombinés prototrophes haploïdes dans la descendance de diploïdes (lys1./lys1.) hétérozygotes

Diploïdes	Nbre de diploïdes testés(1)	Nbre de spores étalées	Nbre de proto-trophes	Estimation des spores lys$^+$ (2)	$\frac{lys^+}{total}$ (3)
(lys1.1/lys1.4)	6 (+2)	$14,9.10^4$	792	775	$(52\pm1,2).10^{-4}$
(lys1.1/lys1.7)	4 (+4)	$16,1.10^4$	1350	1320	$(82\pm6).10^{-4}$
(lys1.1/lys1.8)	4 (+2)	$10,4.10^{+4}$	268	260	$(25\pm4).10^{-4}$
(lys1.1/lys1.10)	4 (+4)	$17,2.10^{+4}$	322	310	$(18\pm3).10^{-4}$
(lys1.1/lys1.13)	4 (+3)	$18,5.10^{+4}$	383	370	$(20\pm2).10^{-4}$
(lys1.1/lys1.21)	3 (+1)	$15,3.10^{+4}$	1220	1180	$(77\pm4).10^{-4}$
(lys1.4/lys1.10)	4 (+1)	$19,2.10^{+4}$	1015	1000	$(52\pm3).10^{-4}$
(lys1.4/lys1.8)	4	$14,5.10^{+4}$	285	280	$(19\pm2).10^{-4}$
(lys1.4/lys1.7)	5 (+2)	$21,2.10^{+4}$	≃1140	≃1120	$(53\pm5).10^{-4}$
(lys1.4/lys1.16)	4	$13,5.10^{+4}$	226	220	$(16\pm2).10^{-4}$
(lys1.7/lys1.8)	3 (+1)	$9,5.10^{+4}$	682	670	$(71\pm5).10^{-4}$
(lys1.7/lys1.10)	4	25.10^{+4}	≃2200	≃2200	$(87\pm4).10^{-4}$
(lys1.7/lys1.13)	4	$15,3.10^{+4}$	588	550	$(36\pm1).10^{-4}$
(lys1.7/lys1.16)	4	$12,5.10^{+4}$	253	240	$(21\pm1).10^{-4}$
(lys1.7/lys1.21)	4	$9,7.10^{+4}$	48	48	$(5\pm0,1).10^{-4}$
(lys1.8/lys1.10)	3 (+1)	$8,5.10^{+4}$	165	160	$(19\pm1).10^{-4}$
(lys1.13/lys1.16)	4	$17,5.10^{+4}$	215	215	$(12\pm1,5).10^{-4}$
(lys1.13/lys1.21)	4	$18,2.10^{+4}$	432	430	$(23\pm1).10^{-4}$
(lys1.16/lys1.21)	4	$11,7.10^4$	178	178	$(15\pm3).10^{-4}$

(1) Entre parenthèses : diploïdes ayant donné un gros excès de lys$^+$

(2) On a testé pour chaque croisement entre 50 et 100 colonies prototrophes sur V8 pour évaluer la fréquence des diploïdes; ceux-ci sont retranchés des prototrophes totaux.

(3) On a mis entre parenthèses la valeur moyenne obtenue en faisant le rapport lys$^+$ corrigé/ spores étalées, suivi de l'écart maximum à cette valeur observé sur les croisements individuels.

des types de"réversion" analysés ci-dessus(il y a une phase de croissance sur V8 au cours de laquelle ces évènements ont pu se produire plus ou moins tôt). Plusieurs artefacts peuvent rendre l'interprétation des résultats difficiles : contamination par des cellules végétatives (on l'estime dans chaque cas en testant 50 à 100 prototrophes sur V8), conversion ou suppression des marqueurs dans une partie de la population, amas de spores (peu important en théorie car il y a très peu de chances pour que deux spores prototrophes soient dans le même amas), fusion de spores (il n'y en a sans doute pas sur milieu minéral) et surtout anisogénie résiduelle des souches.

On a essayé de confirmer ces résultats par l'étude des conversions induites par les rayons γ : on compare les pentes des droites d'induction de conversions en fonction de la dose pour différents trios de diploïdes lys⁻ (voir fig.22). Les résultats sont assez reproductibles, mais on observe souvent une chute de l'induction à 4KR et 6KR, ce qui est sans doute dû à l'effet de l'anoxie sur la radiorésistance (Mortimer el al. 1965). Il n'a pas été tenu compte de ces points. On n'a pas effectué de correction pour les taux de réversion homoallélique qui sont très faibles dans ces conditions pour tous les marqueurs testés (voir tableau 36). Les deux cartes obtenues (fig.23) ne sont pas cohérentes entre elles ni même intérieurement (surtout la carte méiotique). Les cartes de conversion induites par les γ ou les rayons X sOnt généralement plus cohérentes et les coefficients d'additivité sont proches de 1 (Korch et Snow 1973), sans doute parce que ces agents affectent l'ADN au hasard (Brookes et Lawley 1964) : on constate que dans notre cas, si on néglige les croisements faisant intervenir le locus (lys1.13) il en est bien ainsi. On aboutit alors à une taille minimum du gène (lys1.) de trois unités γ (prototrophes/10^8 cellules/rad.) soit environ 8 unités X (si les mêmes corrections sont applicables chez *S. cerevisiae* et *S. lipolytica*:

../..

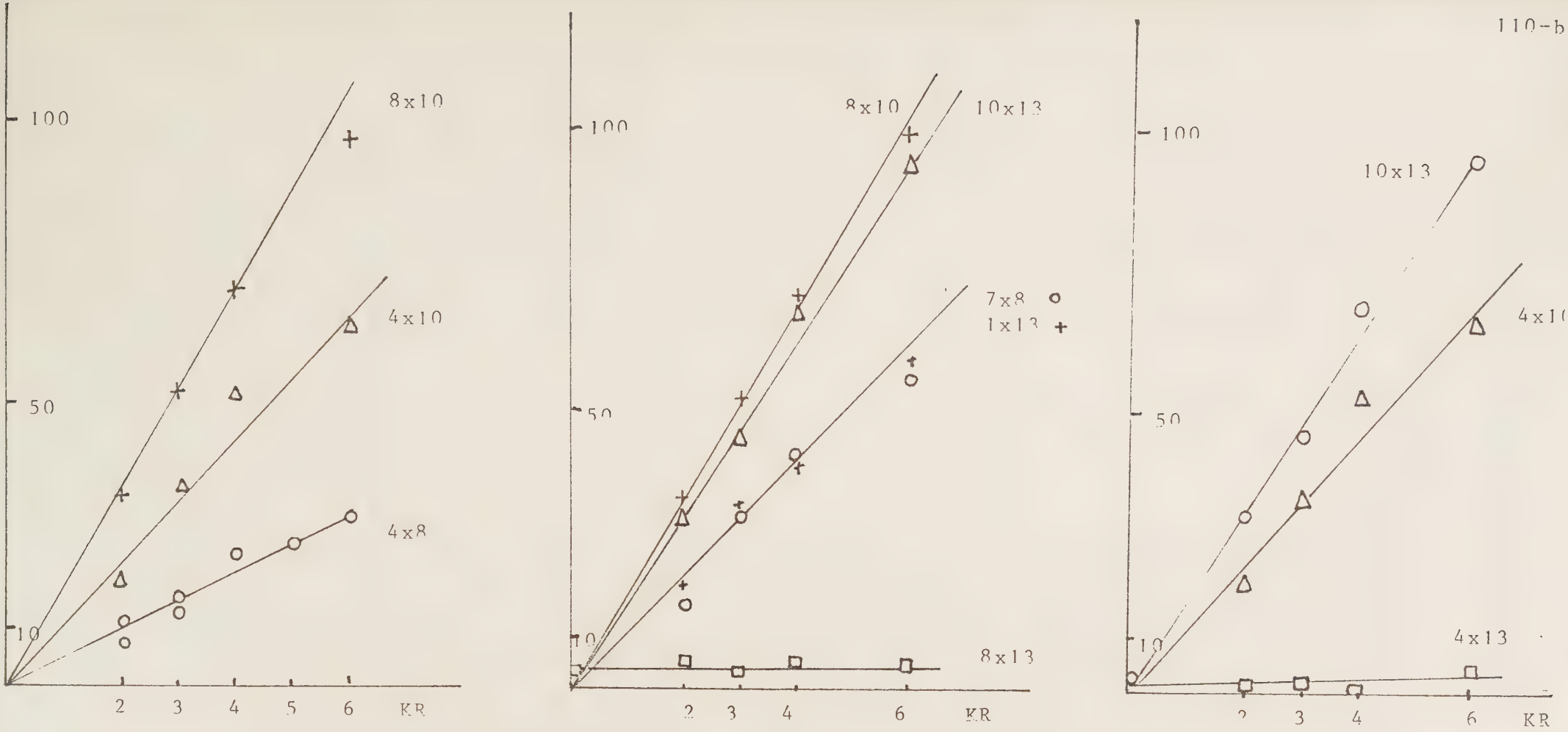


Fig. 22. Conversions induites aux rayons γ dans des hétérozygotes (lys1./lys1).

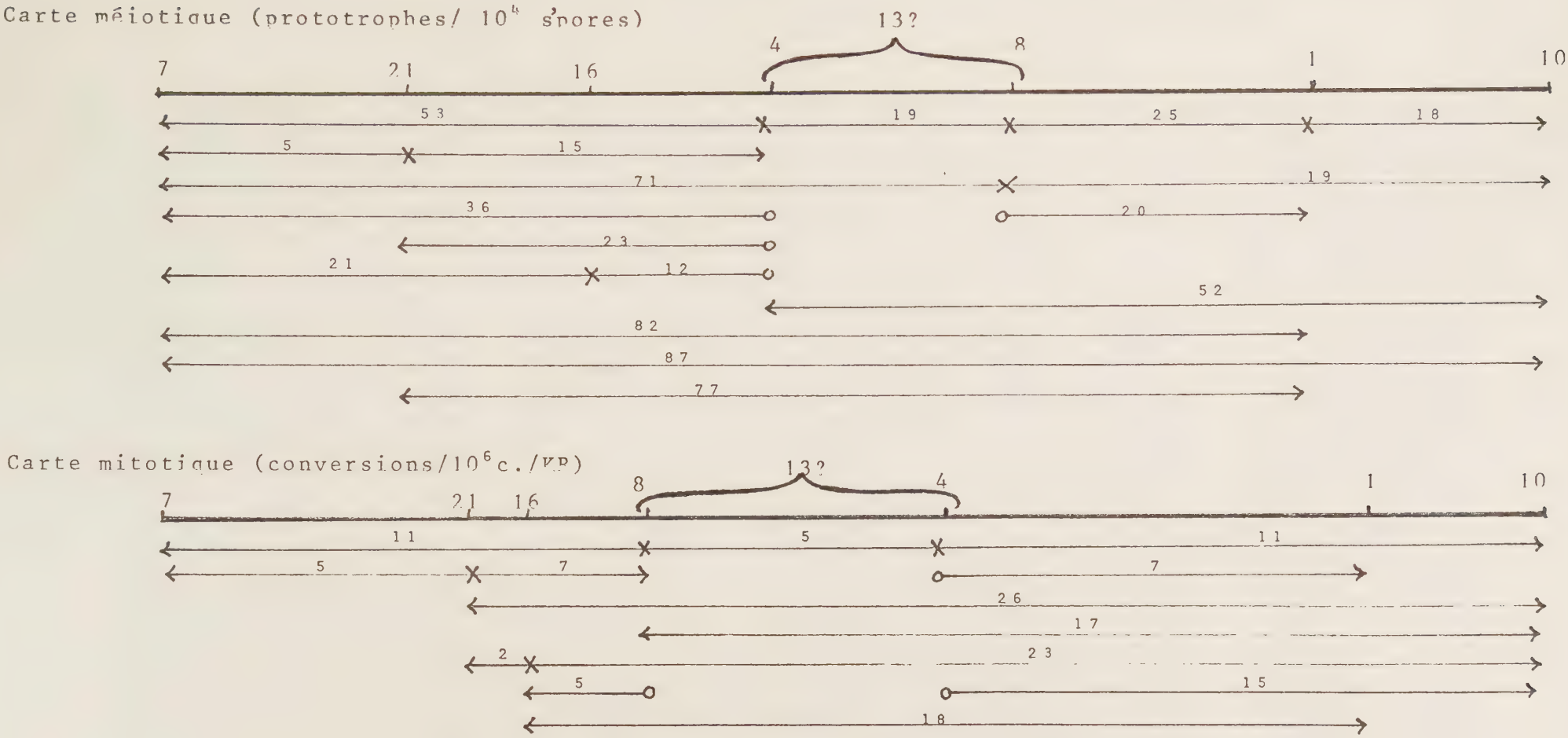
Voir texte pour les conditions expérimentales (page 22).
En ordonnées: conversions induites pour 10^6 cellules; en abscisses, dose de rayonnement γ en kilorads. Les allèles sont indiqués en regard des courbes correspondantes.

Tableau 36 - Conversions induites pour 10^6 cellules (doses en KR)

	Réversions déduites	Doses en kilorads 0	2	3	4	6	Conversions/ KR/10^6 cell.	Coef. d'additivité
(lys1.1/lys1.13)	32	0	14	36	60	65	7	
(lys1.1/lys1.16)	119	0	35	52	68	97	18	0,67
(lys1.13/lys1.16)	0	0	9	14	18	31	5	
(lys1.13/lys1.10)	100	0	31	44	68	94	15	0,87
(lys1.16/lys1.10)	247	0	50	65	94	122	23	
(lys1.16/lys1.21)	0	0	5	5	9	12	2	0,96
(lys1.21/lys1.10)	116	0	50	80	100	132	26	
(lys1.8/lys1.21)	11	0	15	20	31	40	7	0,93
(lys1.10/lys1.8)	232	0	34	52	70	98	17	
(lys1.4/lys1.10)	100	0	18	35	54	64	11	0,94
(lys1.4/lys1.8)	145	0	11	15	25	33	5	
(lys1.13/lys1.4)	0	10	7	10	10	9	< 1	0
(lys1.13/lys1.8)	0	6	8	10	7	10	< 1	
(lys1.8/lys1.21)	11	0	15	20	31	40	7	
(lys1.7/lys1.8)	52	0	16	33	45	53	12	1,09
(lys1.7/lys1.21)	25	0	9	16	22	28	5	
(lys1.1/lys1.1)	15	0	1	2	0	1	< 1	
(lys1.4/lys1.4)	9	2	0	1	3	1	< 1	
(lys1.7/lys1.7)	0	0	0	0	0	0	< 1	
(lys1.8/lys1.8)	3	1	0	2	0	0	< 1	
(lys1.10/lys1.10)	0	0	0	0	0	0	< 1	
(lys1.13/lys1.13)	0	0	0	0	0	0	< 1	
(lys1.16/lys1.16)	11	5	0	7	2	3	< 1	
(lys1.21/lys1.21)	0	0	0	0	0	0	< 1	

* On a déduit de tous les comptages les valeurs indiquées qui correspondent à des conversions préexistantes.

Fig. 23. Cartes génétiques hypothétiques du locus (lys1.)



L'allèle (lys1.13) ne recombine pas avec (lys1.4) et (lys1.8). Les "distances" sont données en petits chiffres, les allèles en grand.

facteur 2,7 de réduction de la sensibilité en anoxie - voir Korch 1970 -). En admettant toujours que les mêmes relations puissent s'appliquer chez *S. cerevisiae* et *S. lipolytica*, on obtient une taille minimum du gène correspondant à 1050 paires de bases, ou une protéine de 350 acides aminés au moins (Parker et Sherman 1969, Korch et Snow 1970).

Le marqueur (lys1.13) pose un problème particulier parce qu'il ne recombine pas (ou très peu) à la méiose ni après induction aux γ avec les marqueurs (lys1.8) et (lys1.4). Il possède également un taux de réversion très faible, mais complémente bien avec (lys1.21) et un peu avec (lys1.7) - voir tableau 30 -. Il ne semble pas qu'il puisse s'agir d'une délétion ou d'un remaniement chromosomique important couvrant les positions (lys1.8) et (lys1.4), celles-ci sont séparées par 0,5 unités γ. Il pourrait s'agir d'une mutation supprimant la recombinaison sur une partie de l'ADN, mais n'empêchant pas sa transcription en une protéine altérée mais entière.

Les mutationsinduites ne présentent pas de groupement particulier : on constate par exemple que les mutations (lys1.7) (lys1.4), (lys1.8) et (lys1.10) qui conduisent fréquemment après réversion à une désensibilisation de l'enzyme à ses effecteurs (voir III,A)ne sont pas groupées.

L'ensemble de ces résultats sur la génétique du locus (lys1.) permet de conclure qu'une mutation de type faux-sens peut conduire à une perte totale de l'activité HS et à un phénotype lys^-. On verra plus loin que par réversion, certaines de ces mutations produisent une HS altérée dans ses propriétés allostériques. On peut supposer que le gène (lys1. correspond au gène de structure de l'HS.

On peut également supposer que chez *S. lipolytica*, il existe une HS unique au contraire de la situation décrite chez

../..

S. cerevisiae (Tucci et Ceci 1972a), sauf si la seconde activité n'est pas impliquée dans la biosynthèse de la lysine et ne représente - au moins après extraction , et dans nos conditions - que moins de 1/30è de l'activité de la première (de sorte que même dans les mutants dépourvus de la première activité elle soit indécelable).

L'homocitrate synthétase serait enfin un enzyme oligomérique ainsi que l'indiquent par ailleurs ses caractères allostériques (voir Chapitre II,A).

La possibilité d'un deuxième rôle de l'HS unique de *S. lipolytica* est sans doute à étudier plus en détail. Si on compare les cartes de complémentation et de recombinaison, on constate que la mutation (1.13) non sensible à la réparatio osmotique pourrait être polaire (traduction de 7 vers 10): en dehors d'une confirmation directe de ce point (étude de nouveaux mutants ponctuels en complémentation), il serait intéressant de savoir si l'on peut obtenir des mutants du locus (lys1.) après traitement par des modifications du cadre de lecture.

D. Etude des mutations affectant le système aminoadipate réductase (AAR), loci (LYS2.) et (lys3.)

Ce système assure la transformation de l'α aminoadipate (αAA) en α aminoadipate semialdéhyde (αAASA) en trois étapes (voir fig.15).

$$\alpha AA + ATP \xrightarrow[\text{Activation}]{1} \alpha AA \sim AMP \xrightarrow[\text{Réduction}]{2} \alpha AASA \sim AMP \xrightarrow[\text{Hydrolyse}]{3} \alpha AASA$$

On n'a décrit chez *S. cerevisiae* que des mutations affectant l'une des deux dernières étapes.

1. Mattoon et al. (1961) ont décrit l'accumulation d'un dérivé adénylé de l'α aminoadipate (probablement l'αAA~AMP) par un mutant lysine⁻. Ce mutant n'a été caractérisé ni génétiquement, ni enzymatiquement.

2. Sinha et Bhattacharjee (1970a) ont décrit des mutants différents, capables de catalyser les étapes ATP et $NADPH_2$ dépendantes, mais incapables de former l'αAASA. L'αAASA∿AMP n'est accumulé ni <u>in vivo</u> ni <u>in vitro</u>, car il se redécompose très rapidement en αAA. Ces auteurs ont pu montrer que les étapes 1 et 2 étaient complètement inhibées par l'EDTA dans un extrait sauvage, ils ont essayé de réaliser <u>in vitro</u> un test de complémentation entre extraits mutants et extrait sauvage traité à l'EDTA. L'extrait mutant est préincubé en présence d'ATP et de $NADPH_2$, puis on ajoute l'EDTA et un extrait sauvage : une certaine quantité d'αAASA est formé dans ces conditions suggérant que c'est bien la troisième étape qui manque chez les mutants. Ces mutants se répartissent en deux groupes de complémentation, qui correspondent à deux gènes non liés (Sinha et Bhattacharjee 1971). Il n'y a pas complémentation <u>in vitro</u> entre extraits mutants.

Chez *S. lipolytica*, tous les mutants isolés jusqu'ici sont incapables de catalyser simultanément les étapes 1 et 2 (voir tableau 28). On ne dispose pas de test enzymatique pour la première étape, mais l'analyse des produits accumulés par ces souches (voir tableau 25) a révélé la présence d'amino-adipate et d'adénosine. Si la présence d'αAA s'explique facilement, on peut supposer que la présence d'adénosine résulte soit d'une décomposition d'un des produits de l'AAR (αAA∿AMP ou AASA∿AMP) soit d'un déséquilibre métabolique inconnu. La première hypothèse suppose qu'<u>in vivo</u> au moins les mutants catalysent l'étape 1(et peut-être la deuxième); la seconde serait compatible aussi avec une perte de l'étape d'activation.

a) <u>Etude génétique des mutants AAR⁻</u>

On a vu au chapitre I (tableau 26) que les mutants AAR⁻ se répartissent en deux groupes de complémentation, fortement liés génétiquement (tableau 27). On s'est demandé si toutes les mutations observées pouvaient être considérées comme affectant un même gène, présentant, comme (lys1.) des phénomènes de complémentation intragénique. La carte génétique des

mutations de l'AAR (fig.24) a été établie d'après les données des tableaux 37. Elle montre que les sites des mutations correspondant à un phénotype AAR$^-$ se répartissent en deux groupes nettement séparés (environ 2% de recombinaison méiotique) qui correspondent aux deux groupes de complémentation. En l'absence de mutation polaire caractérisée, une telle répartition n'est pas suffisante pour affirmer l'existence de deux gènes distincts. La longueur de la carte ainsi définie de (lys2.5) à (lys3.20) correspond à environ 120 recombinants prototrophes pour 10^4 spores, ce qui n'est pas très supérieur à la taille du locus (lys1.) : 90 prototrophes pour 10^4 spores. On ne peut donc pas exclure que toutes les mutations affectent le même gène et que la nomenclature (lys2.) et (lys3.) soit abusive. La complémentation observée serait dans ce cas strictement intragénique, et le faible nombre de groupes de complémentation observés serait un effet d'échantillonnage.

b) Etude des conditions de complémentation in vitro

Comme on vient de le voir, l'étude génétique des mutants AAR$^-$ obtenus ne permet pas de préciser si les mutations de type (lys2.) et (lys3.) affectent le même gène ou deux gènes contigus. L'existence d'une forte complémentation in vivo entre ces deux types de mutations pouvait avoir trois interprétations :

- Complémentation intragénique entre sous-unités identique
- Complémentation intergénique entre deux sous-unités d'une même activité ou entre deux activités indépendantes interagissant au sein d'un complexe.
- Complémentation intergénique entre deux activités indépendantes.

La dernière hypothèse est théoriquement la plus facile à tester : si on dispose de mutants affectés dans deux étapes distinctes, on doit pouvoir restaurer une activité in vitro en mélangeant les extraits de deux mutants qui complémentent

../..

Fig. 24 Cartes génétiques hypothétiques des mutations AAR⁻

Carte méiotique en bas (prototrophes/10^4 spores).
Entre parenthèses, résultats obtenus avec (lys6.3)

Carte mitotique en haut(conversions/10^6c./KR).

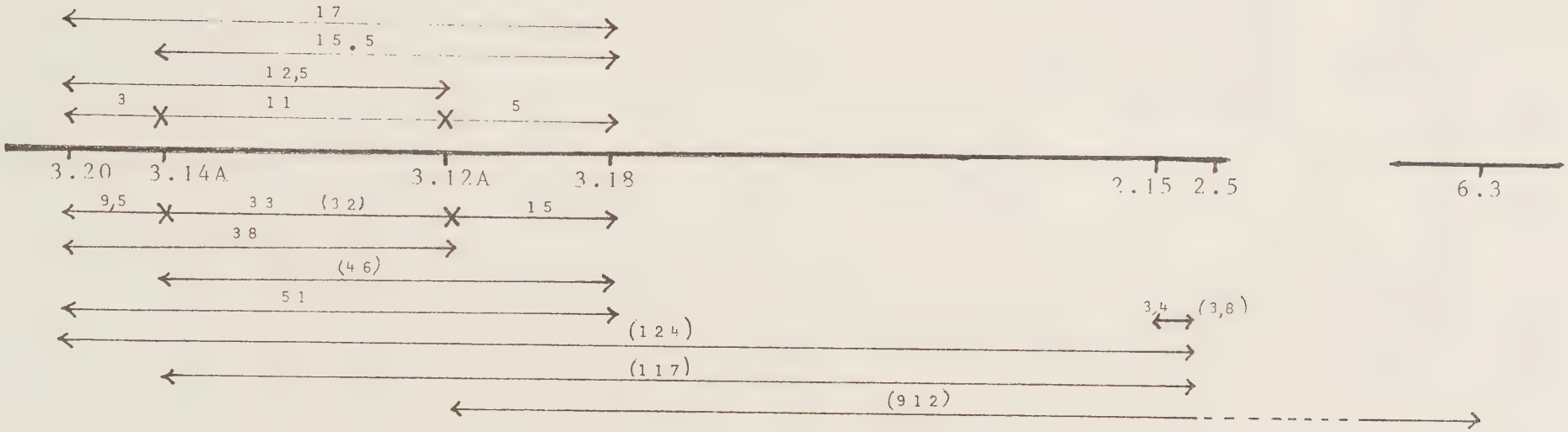


Tableau 37 - Recombinaisons entre mutations AAR-

A. Analyse de spores en vrac

Diploïdes (1)	Nbre de spores étalées (2)	Nbre de prototrophes (3)	$\frac{lys^+}{total}$
(lys3.12A/lys3.14A)	$8,5.10^4$	284	$(33\pm1,5).10^{-4}$
(lys3.12A/lys3.18)	$4,5.10^4$	69	$(15\pm1).10^{-4}$
(lys3.12A/lys3.20)	$11,2.10^4$	433	$(38\pm3).10^{-4}$
(lys3.14A/lys3.20)	$7,4.10^4$	70	$(9,5\pm0,7)10^{-4}$
(lys3.20/lys3.18)	$8,1.10^4$	413	$(51\pm8).10^{-4}$
(lys2.5/lys2.15)	$17,5.10^4$	60	$(3,4\pm0,7).10^{-4}$
(lys6.3,lys2.5/+,lys2.15)	$9,4.10^4$	36	$(3,8\pm0,7).10^{-4}$
(lys6.3,lys2.5/+,lys3.20)	$3,2.10^4$	397 *	$(124\pm9).10^{-4}$
(lys6.3,lys2.5/+,lys3.14A)	$2,9.10^4$	339 *	$(117\pm7).10^{-4}$
(lys6.3,lys3.14A/+,lys2.5)	$1,6.10^4$	0 *	$< 1 .10^{-4}$
(lys6.3,lys3.14A/+,lys2.15)	$2,7.10^4$	0 *	$< 1 .10^{-4}$
(lys6.3,lys3.14A/+,lys3.20)	$3,7.10^4$	1	$< 1 .10^{-4}$
(lys6.3,lys3.14A/+,lys3.18)	$4,2.10^4$	195	$(46\pm2,1).10^{-4}$
(lys6.3,lys3.14A/+,lys3.12A)	$5,7.10^4$	185	$(32\pm1).10^{-4}$

(1) Pour l'utilisation de (lys6.3) voir 2è partie C et tableau 23

(2) Résultats de 2 diploïdes au moins

(3) Pas de correction pour les prototrophes diploïdes sauf où indiqué * (diploïdes prototrophes)

B. Conversions induites aux γ pour 10^6cellules

Diploïdes (1)	Réversions déduites	Doses en KR 0	1	2	3	4	Conversions/KR/10^6cell	Coef.d'additivité (2)
(lys3.20/lys3.14A)	0	0	4	5	10	11	3	
(lys3.20/lys3.12A)	16	0	14	23	39	48	12,5	0,89
(lys3.12A/lys3.14A)	25	0	8	21	33	45	11	
(lys3.14A/lys3.18)	27	0	14	33	49	60	15,5	0,97
*(lys3.12A/lys3.18)	0	0	4	11	14	21	5	
(lys3.12A/lys3.20)	16	0	14	23	39	48	12,5	0,97
(lys3.20/lys3.18)	37	0	19	33	56	67	17	
*(lys3.14A/lys3.18)	27	0	14	33	49	60	15,5	0,92
*(lys3.20/lys3.14A)	0	0	4	5	10	11	3	

(1) Ceux marqués * n'ont pas été refaits deux fois

(2) Pour un trio ordonné a b c $\frac{ac}{ab+bc}$

in vivo. Pour cela, les extraits bruts ou les fractions $(NH_4)_2SO_4$ 30-50% dialysées des haploïdes à tester ont été incubées ensemble 0 et 10 min. dans le tampon d'extraction de l'AAR; l'extrait de W29 ne perd pas d'activité dans ces conditions. On n'a pas pu détecter de complémentation, (voir tableau 38), qu'il y ait eu ou non préincubation des extraits à doser. Il faut noter que, si on s'est assuré que les extraits bruts des mutants n'apportaient pas d'inhibiteurs de l'activité de W29, on ne sait pas si les enzymes extraits des mutants précipitent comme ceux du sauvage dans la gamme de concentration choisie. L'étude des conditions de complémentation in vitro pourra être reprise quand on disposera d'une technique de dosage pour l'étape d'activation, et que les conditions de purification et de séparation éventuelle des activités de la souche sauvage auront été définies.

Ce résultat négatif rend peu probable l'hypothèse que les groupes de complémentation définis génétiquement puissent correspondre à deux activités indépendantes; il ne permet pas de trancher entre les deux premières hypothèses énoncées plus haut.

c) Etude des conditions de complémentation in vivo

Bien que tous les mutants AAR$^-$ apparaissent strictement récessifs (temps de génération et pool de lysine libre des diploïdes AAR$^-$/+ inchangés par rapport au sauvage, on constate qu'ils présentent tous environ 50% de l'activité AAR du sauvage (voir tableau 38). Ce résultat suggère que l'AAR n'est pas une étape limitante dans la production de lysine de la souche sauvage.

Il suggère également qu'aucun des mutants testés n'est affecté uniquement dans l'étape de réduction : on a vu en effet dans la première partie (voir conditions de dosage de l'AAR) que l'étape d'activation semblait limitante quand on mesure l'AAR par l'oxydation du $NADPH_2$ (de sorte qu'on n'a pas pu définir de demi saturation par le $NADPH_2$). On a vérifié en

../..

triplant les concentrations de $NADPH_2$ que la mesure de l'activité AAR des diploïdes (lys3.12A/+) et (lys2.15/+) avait bien été faite à saturation de $NADPH_2$. Or si l'on disposait de diploïdes $\frac{1^+}{1+}$ $\frac{2^-}{2+}$ $\frac{3^+}{3^+}$, on s'attend à ce que l'étape 1 d'activation soit "moins limitante" que dans un diploïde $\frac{1^+}{1+}$ $\frac{2^+}{2^+}$ $\frac{3^+}{3^+}$ et à ce que la mesure globale de 1+2 donne un résultat supérieur à la demi activité du sauvage.

Il est cependant possible d'observer un tel résultat, même si certains mutants sont affectés dans l'étape de réduction, à condition de supposer que les deux premières étapes sont catalysées par un complexe des activités ATP et $NADPH_2$ dépendantes, de sorte que le produit (s'il existe) d'un complexe (1^+ 2) n'est pas utilisé par le complexe (1^+ 2^+). On a en effet de bonnes raisons de penser que l'α AA∿AMP est très instable ou qu'on ne peut pas l'accumuler en présence d'αAA, d'ATP et d'un extrait de W29 : on devrait observer, après addition du $NADPH_2$, une stimulation transitoire de l'activité (meilleure saturation de la réductase par l'α AA∿AMP préformé) puis un retour à l'activité normale lorsqu'on sera revenu aux conditions normales de limitation par la première étape. On n'a jamais pu mettre ce phénomène en évidence (concentrations finales de $NADPH_2$: 0,2 mM -conditions standard - et 1 mM). Cela peut signifier que l'α AA∿AMP formé est instable ou bien qu'il existe une relation entre les activités 1 et 2, de sorte que la première réaction n'a lieu que si la seconde est possible; les deux alternatives sont d'ailleurs compatibles.

Les diploïdes hétérozygotes (lys2./lys3.) ont un temps de génération et un pool de lysine voisins de ceux du sauvage, bien qu'ils présentent <u>in vitro</u> moins de 1/3 de l'activité AAR du sauvage, ce qui renforce encore l'hypothèse que cette étape n'est pas limitante dans la souche sauvage et qu'il existe une interaction entre les produits de (lys2.) et (lys3.) - voir tableau 38 -. Notons que si l'on admet que seuls les complexes entre produits actifs des allèles (lys2.) et (lys3.) sont actifs (1/4 des complexes possibles), les

../..

les résultats obtenus ne sont pas significativement différents des valeurs attendues.

Tableau 38 - Etude enzymatique de la complémentation dans le système AAR

A. Complémentation in vitro

Extraits utilisés		A.S. AAR (nmoles $NADPH_2$/mg prot/min
Extraits bruts	W29 (1)	9,96
	lys5 + lys14A (b)	0
	lys5 + lys18 (b)	0
	lys5 + lys20 (b)	0
	lys15 + lys14A (b)	0
	lys15 + lys18 (b)	0
	W29 + lys15 (c)	4,42
	W29 + lys12A (c)	5,91
	W29 + lys18 (c)	4,57
$(NH_4)_2SO_4$ (40-50%) dialyse 3 H.	W29 (a)	37,0
	lys5 + lys12A (b)	0
	lys5 + lys18 (b)	0
	lys15 + lys18 (b)	0
	lys15 + lys12A (b)	0
	W29 + lys15 (c)	17,5
	W29 + lys12A (c)	19,2
	W29 + lys18 (c)	16,4

Extraits préincubés 10 min. à 25°C dans un tampon TRIS-HCl 0,01 M pH 8,0, $MgCl_2$ 1 mM, GSH 1 mM, glycérol 20%. Tous les extraits ont à peu près la même concentration en protéines. Les conditions de dosage ont été décrites dans la première partie. On a mélangé volume à volume les extraits avant la préincubation.
On a utilisé les quantités d'extraits : (a):10 µl, (b): 40 µl, (c): 20 µl

Tableau 38 (suite)

B. Complémentation in vivo

Souches (génotypes)	Temps de génération (heures) (1)	Pool de lysine mM/g. de PS (1)	AS.AAR nmoles $NADPH_2$/mg/min
(+/+)	2,0	23	9,95
(lys3.12A/+)	2,2	21	4,60
(lys2.5/+)	2,2	22	5,20
(lys2.15/+)	2,1	23	5,10
(lys3.18/+)	2,0	20	5,40
(+/+)	2,0	22	10,60
(lys3.12A/lys3.18)			0
(lys3.12A/lys3.20)			0
(lys2.5/lys2.15)			0
(lys2.5/lys3.20)	2,1	21	2,60
(lys2.5/lys3.12A)	2,0	20	2,46
(lys2.5/lys3.18)	2,0	22	2,20
(lys2.15/lys3.12A)	2,10	21	2,60
(lys2.15/lys3.18)	2,10	20	2,57

(1) Déterminés pour les souches prototrophes sur N5000

(2) On n'a pas utilisé le marqueur (lys3.14A) qui est leaky.

d) Conclusion

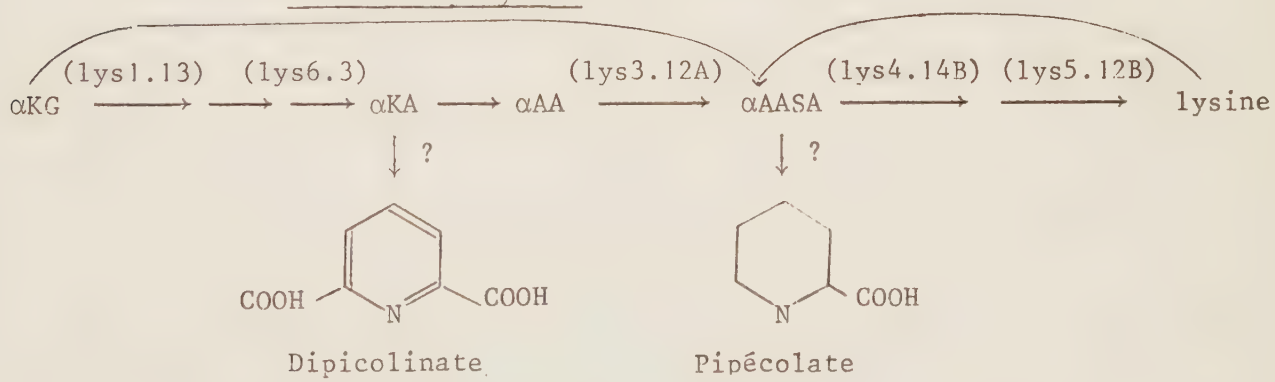
Il y a de fortes probabilités pour que les produits des gènes (lys2.) et (lys3.) interagissent in vivo, mais on n'a pas pu s'assurer qu'il s'agissait de deux activités différentes complexées ou d'une même activité impliquant l'intéraction de deux sous-unités. Il y a peu de chances que nos mutants soient les analogues de ceux qui ont été décrits chez *S. cerevisiae* par Sinha et Bhattacharjee (1970) : ils sont incapables de catalyser les étapes ATP et $NADPH_2$ dépendantes ou de complémenter in vitro avec un extrait sauvage traité par l'EDTA. Une étude enzymologique plus précise et l'isolement de nouveaux mutants AAR^- permettrait sans doute de mieux comprendre les phénomènes observés.

../..

E. Recherche d'un branchement de la voie

Certains intermédiaires de la voie de la lysine sont utilisés pour la biosynthèse d'antibiotiques chez certains champignons (Demain 1972). Certains Arguments indirects ont laissé supposer l'existence d'un branchement chez les levures aussi (Tucci et Ceci 1972b). Chez *S. lipolytica* on a constaté que le premier enzyme de la voie était sensible à des effecteurs allostériques autres que la lysine et ses analogues structuraux, et que l'utilisation du pipécolate comme source d'azote supposait sa conversion préalable en lysine (voir 4è partie). Aucun des simples mutants isolés jusqu'ici ne présente d'autre besoin qu'en lysine; ce phénomène peut avoir trois explications dans l'hypothèse d'un branchement : les produits dérivés ne sont pas indispensables il existe des voies secondaires de production, ou bien ils peuvent se former dans tous les mutants isolés. En l'absence d'indication sur la nature de ces composés chez *S. lipolytica*, on n'a testé que le phénotype de certains doubles mutants. On constate en effet sur la fig.25 qu'aucun bloc unique dans la voie de biosynthèse ne peut carencer une souche cultivée sur lysine en AASA et ses dérivés éventuels (les dernières étapes sont réversibles) : il pouvait être intéressant d'étudier des mutants AAR⁻ et SDH⁻ ou AAR⁻ et AASAGR⁻

Fig.25 - Branchements possibles de la voie de la lysine chez *S. lipolytica*



On n'a indiqué que les dérivés pour lesquels une action au niveau du premier enzyme a été constatée. On a représenté également la voie de régénération possible de l'AASA à partir de la lysine (lysine αcétoglutarate amino-transférase ,cf. Soda et Misono 1971)

Les mutations choisies avaient respectivement pour but d'empêcher la conversion d'α KG en α AA (lys1.13 et lys6.3), d'α AA en α AASA (lys3.12A.), de lysine en α AASA (lys4.14B et lys5.12B). Il faut cependant remarquer que chez certains microorganismes, on a décrit une activité enzymatique qui produit de l'α aminoadipate semialdéhyde à partir de la lysine et de l'α cétoglutarate (Soda et Misono 1971)

Les doubles mutants isolés poussent mal et certains excrètent un pigment vert, mais on ne peut pas restaurer une croissance normale par addition d'aminoadipate, de pipécolate ou de dipicolinate (voir tableau 39)

Tableau 39 - Croissance de doubles mutants (lys1., lys3.), lys1., lys4.) et (lys6., lys3.)

Souches testées (génotypes)	Temps de génération en heures sur N5000 supplémenté							
	lysine 100mg/l	lysine 1g/l	lysine + α AA 100mg/l	100mg/l	lysine +pipécolate 100mg/l	100mg/l	lysine+dipicolinat 100mg/l	100mg/l
W29	2h.15	2h.	2h.30		2h.20		2h.15	
(lys1.13)	2h.30							
(lys3.12A)	2h.55							
(lys5.12B)	2h.40							
(lys6.3)	2h.15							
(lys1.13,lys3.12A)	3h.15	2h.	3h.20		3h.		3h.20	
(lys6.3,lys3.12A)	3h.25	3h.10	3h.30		3h.20		3h.30	
(lys1.13,lys5.12B)	7h.30	7h.45	7h.		7h.15		7h.15	
(lys6.3,lys4.14B)	7h.20	7h.30	7h.10		7h.10		7h.30	
(lys3.12A,lys5.12B)	8h.30	8h.45	8h.30		8h.40		8h.45	

On a vérifié qu'ils accumulaient tous le pipécolate et l'α AA (ajoutés dans le milieu) par chromatographie; on n'a pas pu s'assurer de l'entrée du DPA. L'addition de 2 ou des 3 composés étudiés à la fois n'améliore pas non plus la croissance, peut-être parce qu'il y a compétition pour l'entrée. Il faut remarquer de plus qu'aucun mutant lys$^-$ isolé jusqu'ici ne pousse sur

../..

dipicolinate ou pipécolate : ceci est d'autant plus curieux que la transformation de pipécolate en lysine semble établie) (voir 4è partie) et est peut-être dû aux conditions opératoires (ou à une compartimentation stricte).

On constate que les mutants qui poussent le moins bien sur lysine sont ceux qui sont bloqués dans les transformations de l'αAA en αAASA et de la lysine en αAASA. Les doubles mutants (lys1.13, lys3.12A) sont ceux qui poussent le mieux: il est probable que s'il existe un besoin en aminoadipate semialdéhyde, celui-ci soit principalement couvert par une transformation réverse de la lysine en AASA, plutôt que par l'activité lysine αcétoglutarate aminotransférase dans une souche bloquée avant l'AASA. On peut toutefois penser que, s'il existe un dérivé limitant, d'autres mécanismes assurent sa production, puisque les souches (lys3.12A) lys5.12B) poussent sur lysine seule).

L'origine du pigment vert accumulé par les doubles mutants (lys6.3,lys3.12A) et (lys6.3,lys4.14B) n'a pas été recherchée. Ce pigment est formé par certains mutants précoces et seulement par certaines souches : il est probable qu'une seconde mutation soit impliquée. Il est remarquable que toutes les souches isolées qui sont sensibles à la lysine 100 mg/l forment également un pigment d'un vert intense.

Conclusion

La biosynthèse de la lysine implique au moins 11 étapes enzymatiques (fig.15) et on n'a, pour l'instant, défini que 10 gènes distincts qui par mutation donnent un phénotype lys^- (11 si l'on admet que (lys2.) et (lys3.) sont deux gènes). On sait de plus qu'une mutation dans deux gènes distincts au moins conduit à la perte phénotypique de l'activité HS (loci (lys1.) et (lys11.)). Comme ce cas semble fréquent chez les levures (voir Bhattacharjee et Sinha 1971, pour la lysine; Masselot et Robichon Szulmajster 1975, pour la méthionine) il est extrêmement probable que d'autres types de mutants pourront être obtenus.

../..

La majorité des mutants obtenus sont affectés dans l'homocitrate synthétase.. Cette situation est très différente de celle qui prévaut chez *S. cerevisiae* : sur 2053 mutants lys⁻ isolés,85% étaient affectés dans la saccharopine déshydrogénase, l'AAR et l'homoaconitate, aucun n'était homocitrate synthétase⁻ (Biswas et Bhattacharjee 1974, résultats obtenus avec 4 mutagènes différents). On observe par ailleurs que les 6 mutants AAR⁻ obtenus ici ont une activité homocitrate synthétase plus élevée que le sauvage ; ce phénomène semble spécifique de ce genre de mutation.

Certains mutants lys⁻ de *S. cerevisiae* sont affectés dans le cycle de Krebs ou la respiration (Robichon Szulmajster 1969). Aucun mutant lys⁻ de *S. lipolytica* isolé jusqu'ici ne présente une croissance ralentie sur milieu minimum en présence de lysine (mis à part certains doubles mutants décrits ci-dessus). Il est possible que les mutants pléiotropiques aient été contre sélectionnés (voir mutants du locus (lys1.) ? On peut supposer par contre que certains dérivés de la voie, qui ont sans doute plusieurs modes de formation, jouent un rôle encore inconnu. Cette hypothèse pourrait être explorée en suivant le devenir de certains précurseurs marqués (AA, KA, pipécolate) dans des souches altérées en différents points de la voie de biosynthèse. Notons à ce sujet qu'on a décrit récemment une souche de levure, dans laquelle un besoin en lysine pouvait être compensé par le pipécolate (Kurtz et Bhattarcharjee 1975).

II. APPROCHE PHYSIOLOGIQUE DES ELEMENTS DE REGULATION DE LA VOIE

Deux méthodes ont été utilisées. La première et la plus directe consiste à rechercher in vitro des effecteurs des activités enzymatiques qu'on sait doser. Cette méthode est fortement limitée dans notre cas parce que peu d'étapes peuvent être caractérisées enzymatiquement et que les activités mesurables n'ont pas été purifiées. La deuxième méthode consiste à comparer des mutants affectés en différents endroits de la voie. La valeur de l'interprétation dépendra ici encore du degré de caractérisation des mutants: on a

vu en particulier que, hormis les mutants homocitrate synthétase⁻, les mutants précoces n'ont pas été définis de façon précise

A. Etude des effecteurs de l'activité homocitrate synthétase

a) Résumé des premières observations

Ces résultats sont rassemblés dans la publication jointe (voir 4è partie).

L'homocitrate synthétase (HS) catalyse la condensation de l'acétyl coenzyme A (AcCoA) sur l'α cétoglutarate (α KG) suivant le schéma réactionnel suivant :

La fixation de l'AcCoA est coopérative en l'absence d'effecteurs ($\bar{n}$ = 1,7) tandis que la coopérativité des sites de l'α KG n'est révélée qu'en présence de lysine ($\bar{n}$ = 1,8). La lysine est un inhibiteur compétitif de la fixation de l'α KG, elle se fixe de façon coopérative sur l'enzyme ($\bar{n}'$ = 2,3) . L'inhibition par la lysine est très stéréospécifique, et seuls certains analogues structuralement proches sont inhibiteurs : la DL-4-5-transdéshydrolysine et la DL (amino 3) cyclohexylalanine, mais pas la DL-S-aminoéthyl-cystéine. Les deux premiers analogues structuraux sont toxiques *in vivo* à 5.10^{-4} M: ils ont pu servir à isoler des mutants affectés dans ce type de contrôle (voir 3ème partie). Nous discuterons des propriétés de l'un d'eux, mg-5, dans ce chapitre.

On a vu ci-dessus qu'on pouvait se demander si, chez cette levure, il n'existait pas un branchement de la voie. Cela nous a amené à tester l'effet inhibiteur sur l'HS de certains intermédiaires et dérivés possibles de la voie. Les résultats observés sont résumés dans le tableau 40. On constate qu'effectivement l'aminoadipate, le pipécolate et le dipicolinate sont des inhibiteurs allostériques de l'activité HS ($\bar{n}'$ compris entre 1,5 et 2,1).

../..

Tableau 40 - Comparaison des effets inhibiteurs de divers composés sur l'HS de W29

Ligands	Type d'inhibition observée avec comme substrat variable		Effet s/la coopérativité de fixation de	
	α KG	AcCoA	α KG	AcCoA
Lysine	compétitive	mixte	+	-
Aminoadipate	compétitive	mixte	-	+
Pipécolate	mixte	mixte	-	+
Dipicolinate	mixte	compétitive	+	+
CoASH	pas d'inhibition	compétitive	-	+

Plusieurs arguments indiquent que les sites impliqués dans l'effet de la lysine sont différents de ceux qui sont responsables de l'inhibition par l'aminoadipate, le pipécolate et le dipicolinate : l'inhibition observée n'est pas due à leur analogie structurale avec la lysine

1. Si on conserve l'enzyme une nuit à -10°C, on le désensibilise complètement à l'aminoadipate, au pipécolate et au dipicolinate, sans modifier la fixation des substrats ou l'inhibition par la lysine

2. L'inhibition par la lysine est reproductible d'un extrait à l'autre, celle des autres composés ne l'est pas (entre 0 et 30% d'inhibition à 1 mM)

3. Certaines souches semblent fabriquer un enzyme sensible à la lysine et insensible aux autres inhibiteurs allostériques (voir étude de lys12 ci-dessous).

4. On peut obtenir des mutations localisées dans (lys1.) qui modifient spécifiquement les propriétés allostériques du site de la lysine sans affecter apparemment la fixation des substrats et des autres inhibiteurs (telle la souche mg-5).

../..

Ces résultats semblent indiquer que l'HS est soumis à un double contrôle par rétroinhibition. Il faut souligner que chez *S. lipolytica* l'inhibition par la lysine est très forte in vitro , alors que chez *S. cerevisiae*, Tucci et Ceci(1972b) ont montré in vivo et in vitro que la lysine n'exerçait pas d'effet important sur l'incorporation d'acétate marqué dans l'homocitrate. On montrera plus loin qu'une altération même partielle de ce mécanisme de régulation chez *S. lipolytica* conduit à une augmentation importante de la taille du "pool" de lysine libre. Ce résultat indique que la régulation par rétroinhibition du premier enzyme est l'un des mécanismes essentiels qui assure l'ajustement du "pool" aux besoins de la cellule. Il suggère aussi qu'aucun mécanisme de régulation en aval de cette activité n'est capable de compenser entièrement l'effet d'une altération de ce type.

L'inhibition par l'aminoadipate, le pipécolate et le dipicolinate n'a pas été rapportée par ailleurs, bien qu'un effet de l'aminoadipate sur l'HS ait été recherché (Tucci et Ceci 1972b). Deux remarques préliminaires peuvent être faites à propos de cette discordance.

1. L'inhibition par ces composés est faible et variable dans nos conditions expérimentales. Il est possible que l'enzyme de *S. cerevisiae* soit encore plus instable dans certaines conditions, ou bien que l'effet de ces composés ne soit important qu'en présence de lysine. Nous avons donc recherché des inhibitions dites "concertées".

2. Nous n'avons pas exclu la possibilité d'une inhibition faisant intervenir une protéine fixatrice d'aminoadipate par exemple. Chez *S. cerevisiae*, on a démontré (Betterton et al 1968, Tracy et Kohlhaw 1975) que 95% de l'activité HS était mitochondriale alors que l'aminoadipate et ses dérivés étaient cytoplasmiques.Nous ne connaissons pas la localisation de la voie de la lysine chez *S. lipolytica*,

../..

mais si elle est différente, rien ne s'oppose à ce que des phénomènes d'inhibition de ce type soient variables selon les espèces. Nous avons donc étudié les souches affectées dans l'aminoadipate réductase, du type de lysl pour essayer de définir si l'absence d'inhibition de l'HS par l'aminoadipate était dûe à la modification de cet enzyme fixateur d'aminoadipate.

b) Recherche d'inhibitions concertées

Les études rapportées plus haut ont suggéré que l'HS possède des sites des fixation, pour les inhibiteurs non apparentés différents du ou des site(s) lysine Pour vérifier cette hypothèse, on a conduit une série d'expériences avec différentes paires d'inhibiteurs, et on a comparé l'inhibition causée par chaque inhibiteur seul à celle résultant d'un mélange équinolaire de deux inhibiteurs. Considérant des concentrations totales M d'inhibiteur(s), nous avons appliqué le raisonnement suivant (voir Caskey et al.1964).

- Si deux inhibiteurs ont chacun leur site de fixation propre et que la fixation de l'un n'est pas affectée par la fixation de l'autre, on s'attend à ce que l'activité résiduelle mesurée en présence d'un mélange équimolaire de ces inhibiteurs, de concentration totale M, soit égale au produit des activités résiduelle mesurées en présence de concentrations $M/_2$ de chacun des inhibiteurs. On observera un effet "additif" caractérisé par l'égalité de la valeur expérimentale à la valeur calculée pour une somme d'inhibitions individuelles.

- Si deux inhibiteurs ont un seul et même site de fixation, ils seront en compétition pour ce site. L'effet de concentrations équimolaires de ces inhibiteurs doit être inférieur à la somme des inhibitions individuelles. On observera une "compétition d'inhibiteurs"..

- Si deux sites indépendants sont impliqués et si la fixation d'un des inhibiteurs facilite la fixation de l'autre (effets

coopératifs), l'inhibition résultant du mélange sera supérieure à la somme des inhibitions éventuelles et éventuellement supérieure à l'inhibition individuelle due au meilleur inhibiteur à la concentration M. Dans ce dernier cas, on aura une "inhibition concertée" typique.

Nous avons d'abord testé la réponse de l'HS extraite de W.29. Sur la fig.26, on constate que les inhibitions observées en présence d'un mélange de lysine et d'aminoadipate, de lysine et de pipécolate, de pipécolate et d'aminoadipate, d'aminoadipate et de dipicolinate sont au moins additives et nettement concertées dans le cas de l'aminoadipate et du pipécolate. Ceci conduit à postuler l'existence de trois sites différents au moins : "lysine","aminoadipate","pipécolate", le site de dipicolinate pouvant être confondu ou partiellement commun avec les sites "lysine" et "pipécolate". L'étude des mélanges DPA + pipécolate et DPA + lysine conduit à penser que le dipicolinate se fixe sur le site "pipécolate" et avec une faible affinité sur le site "lysine", soit sur un site qui recouvre partiellement ces sites.

Une souche de type mg-5 a perdu les effets hétérotropes de la lysine, mais elle est encore inhibée par la lysine, quoique faiblement. Deux hypothèses peuvent rendre compte de ce phénomène. La mutation (LYS1.5) a modifié le site "lysine" de sorte que l'enzyme sous forme "active" et sous forme "inactive" a autant d'affinité pour la lysine, mais c'est le même site "lysine" qui est responsable de l'inhibition observée sur des extraits de W29 et de mg-5 : on observera en présence d'un mélange d'inhibiteurs, le même type d'inhibition que pour la souche sauvage. Ou bien il existe deux sites accepteurs de lysine sur l'enzyme, l'un a forte affinité et responsable des effets hétérotropes observés, l'autre à faible affinité : le site à forte affinité a été perdu dans la souche mg-5, l'inhibition résiduelle étant due uniquement au second site. On peut supposer que ce second site à faible affinité pour la lysine, peut accepter un (ou plusieurs) inhibiteur (s) non apparenté (s) à la lysine. On observera dans ce cas une"compétition d'inhibiteurs" en présence de lysine et de cet inhi-

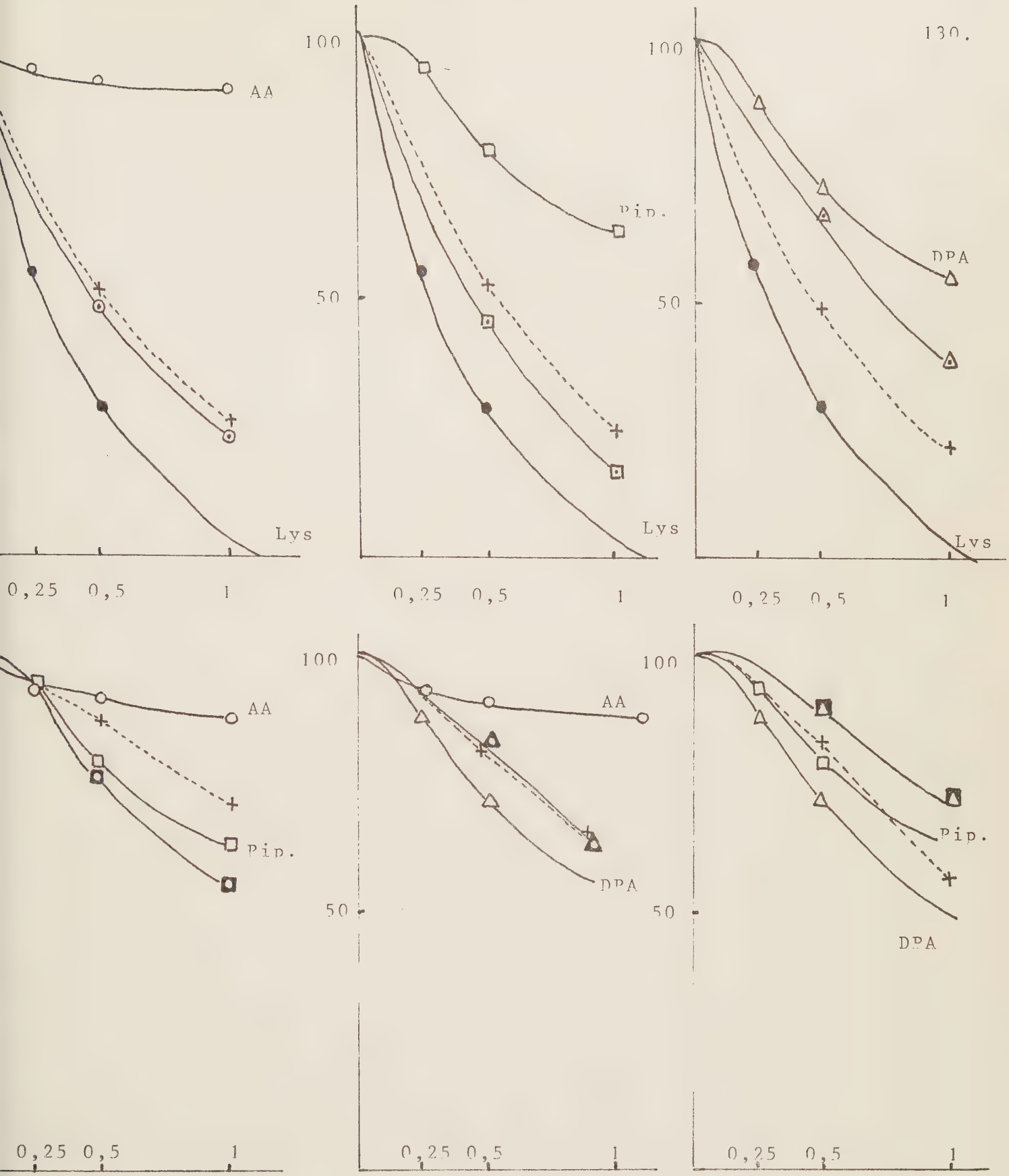


Fig. 26 Recherche d'inhibitions concertées de l'HS. Souche W29.

Activité relative en ordonnées. Symboles doubles: mélange équimolaire d'inhibiteurs (concentration totale en abscisse). En pointillé: courbe théorique d'inhibition calculée à partir des activités résiduelles observées en présence de chaque inhibiteur seul.

AA=aminoadipate; Pip.=pipécolate; DPA=dipicolinate.

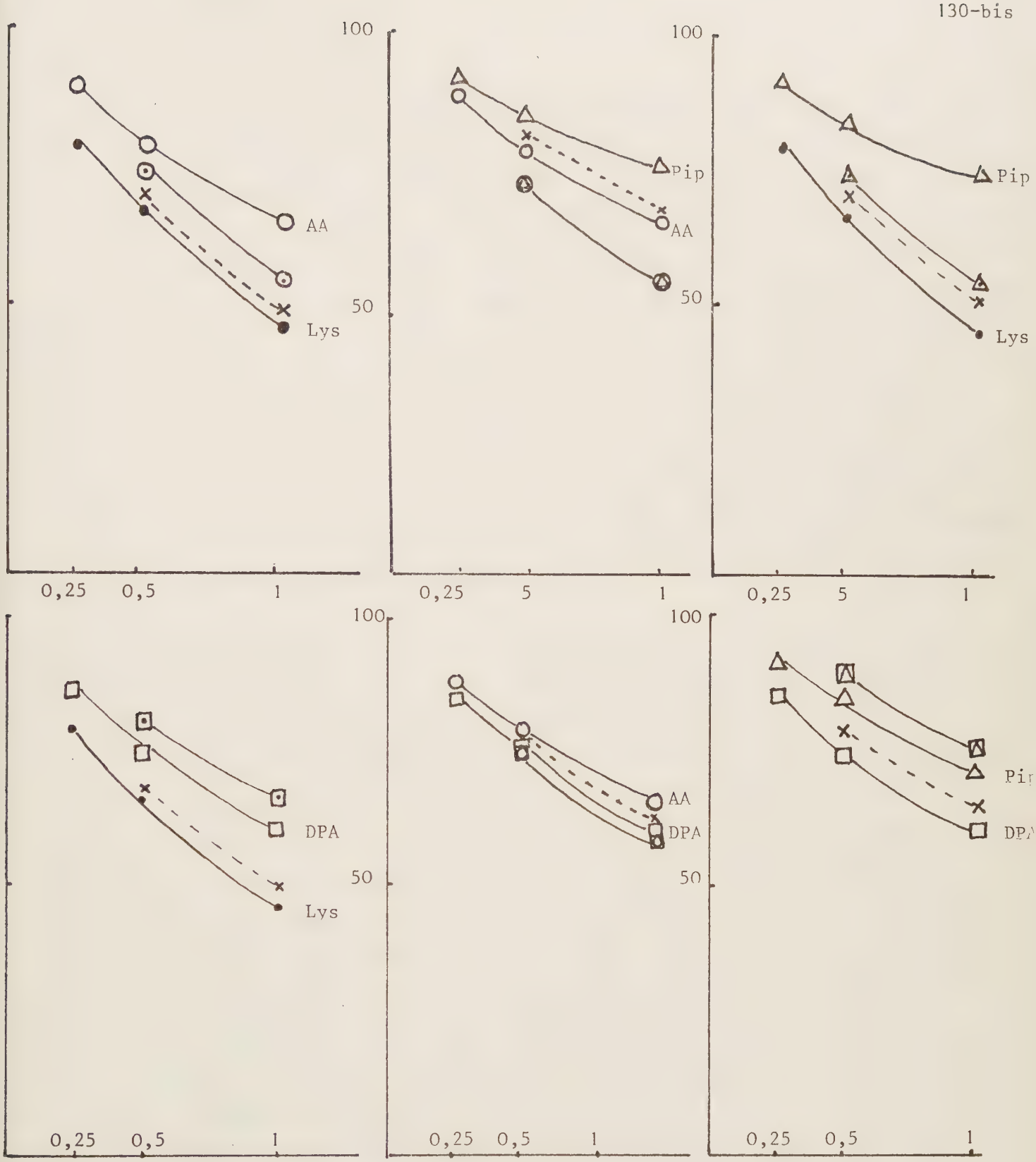


Fig. 27 - Recherche d'inhibitions concertées de l'HS. Souche mg-5

Activité relative en ordonnées. Symboles doubles : mélange équimolaire d'inhibiteurs (concentration totale en abscisse).
En pointillé : courbe théorique d'inhibition calculée à partir des activités résiduelles observées en présence de chaque inhibiteur seul.

AA = aminoadipate; Pip. = pipécolate; DPA = dipicolinate.

biteur. Sur la fig.27, on voit que les inhibitions dues à un mélange lysine + aminoadipate, lysine + pipécolate, aminoadipate + dipicolinate sont toujours au moins de type "additif" et qu'il y a inhibition "concertée" dans le cas du mélange pipécolate + aminoadipate : les sites "aminoadipate" et"pipécolate" sont distincts et différents du ou des site(s)lysine, comme dans la souche W29. Par contre le phénomène de"compétition d'inhibition" observé en présence d'un mélange de lysine et de dipicolinate est beaucoup plus prononcé que dans le cas de l'HS de la souche sauvage : on peut supposer qu'il était masqué dans ce dernier cas par l'inhibition additive due à la lysine sur son site à forte affinité. Les résultats d'inhibition par le mélange lysine + DPA favorisent l'hypothèse qu'il existe deux sites différents pour la lysine sur l'enzyme de la souche sauvage.

On a démontré dans les expériences qui précèdent l'existence d'une inhibition concertée par l'aminoadipate et le pipécolate. En raison de l'analogie structurale des composés testés, on s'est demandé si dans tous les cas on n'avait pas compétition d'inhibitions, de sorte que les inhibitions "additives" observées résultaient de la somme d'inhibitions concertées et de compétitions. On pouvait espérer révéler l'existence d'inhibitions concertées en se plaçant à faible concentration du meilleur inhibiteur (de façon à laisser libre le site du second inhibiteur) et en étudiant l'inhibition produite par des concentrations croissantes du deuxième inhibiteur. Les résultats obtenus sont représentés sur les fig.28 (lysine fixe) et fig 29 (pipécolate fixe) pour des variations de concentrations de l'aminoadipate. On constate dans les deux cas qu'on observe en présence de certaines concentrations de l'inhibiteur variable une inhibition de type concerté, supérieure à la somme des inhibitions individuelles calculées comme précédemment. Pour des concentrations supérieures de l'inhibiteur variable, on observe une "réversion" de l'inhibition concertée et une "compétition d'inhibitions". On peut suppose que ce phénomène est dû au déplacement de l'inhibiteur fixe

../..

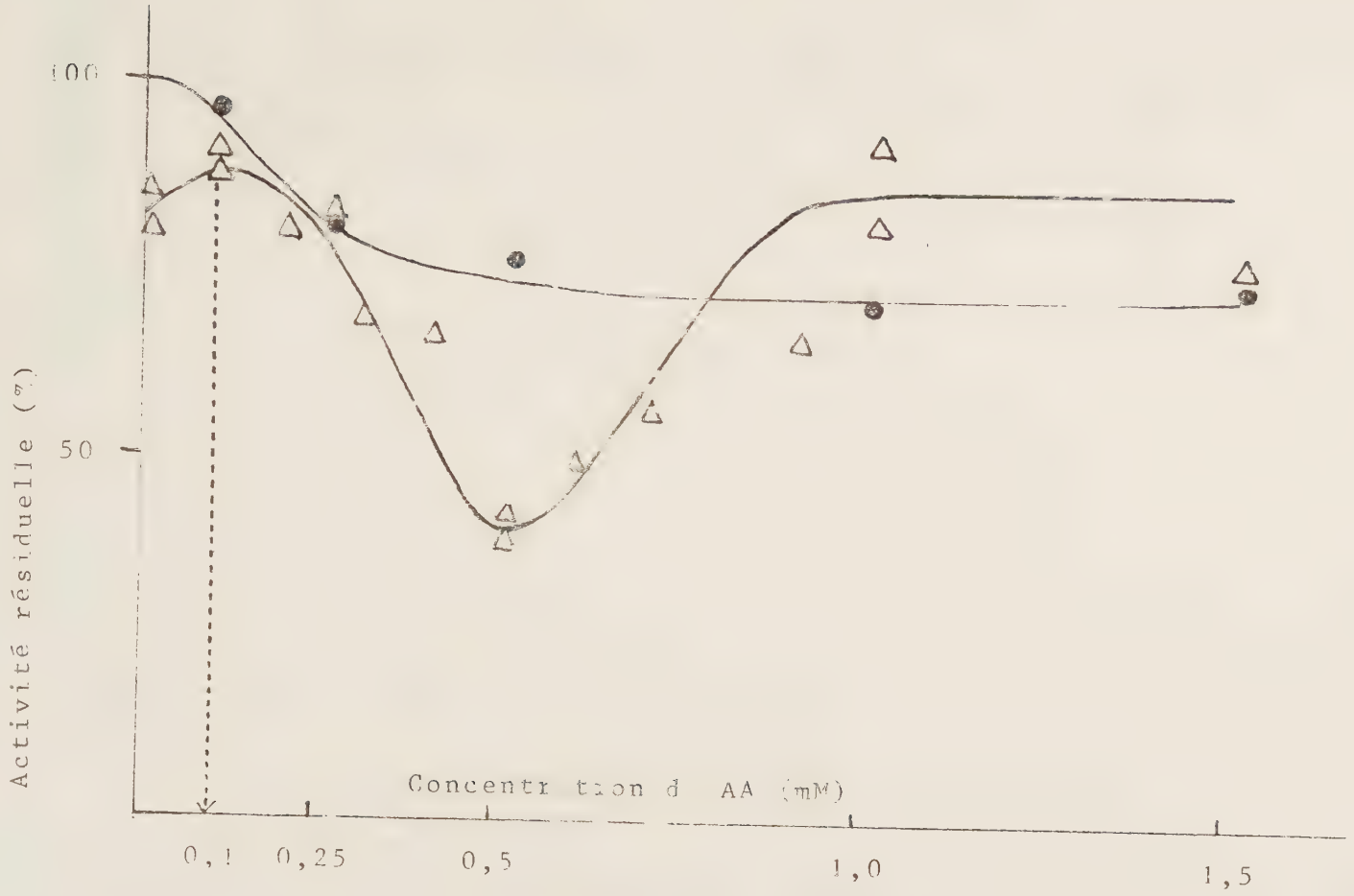


Fig. 28 Recherche d'une inhibition concertée de l'HS par l'αAA et la lysine (N°29)

Inhibition de l'HS par différentes concentrations d'αAA seul (●) et en présence d'une concentration fixe de lysine (0,1 mM) (△).
La flèche en pointillé correspond aux conditions de la figure 26.

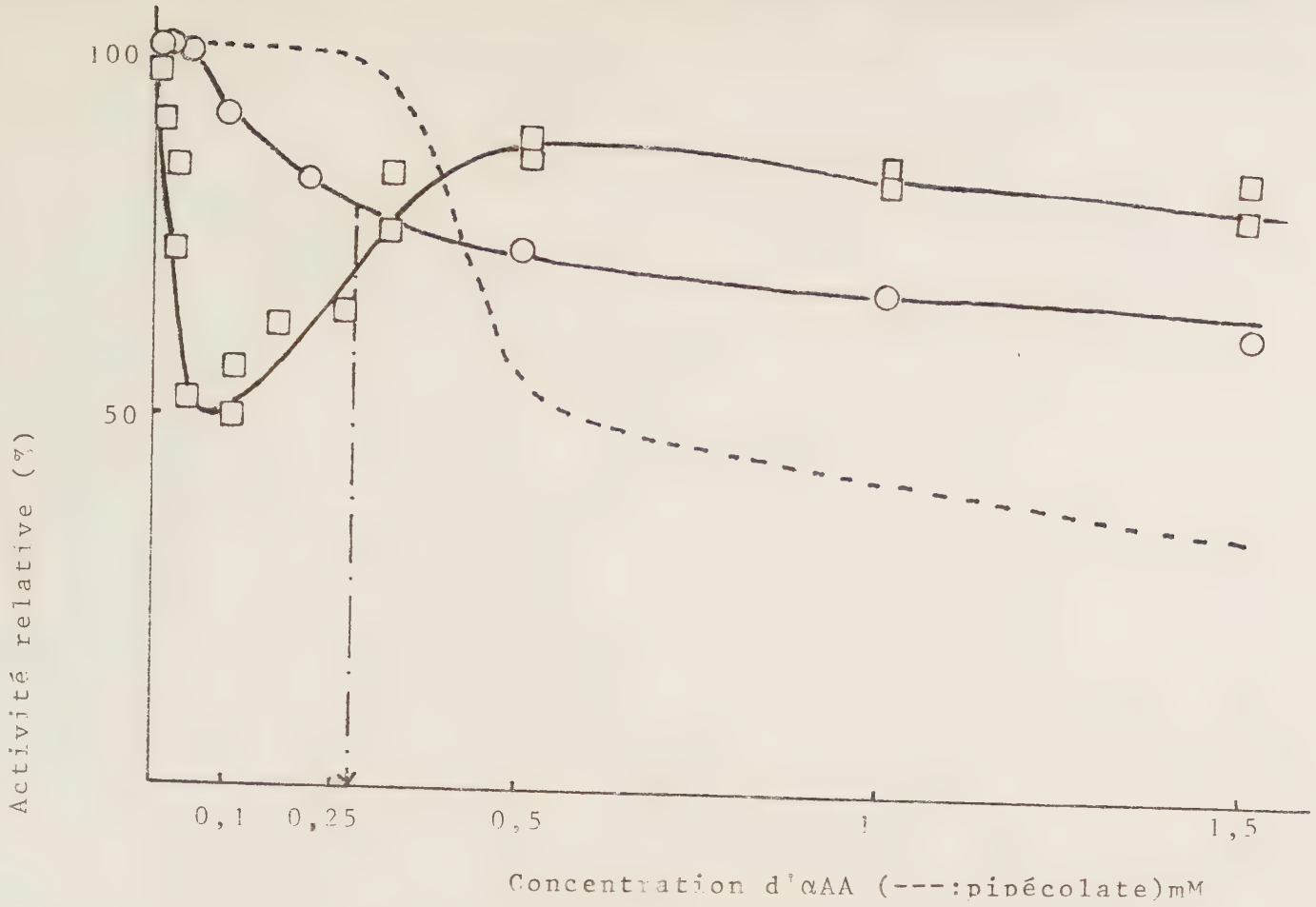


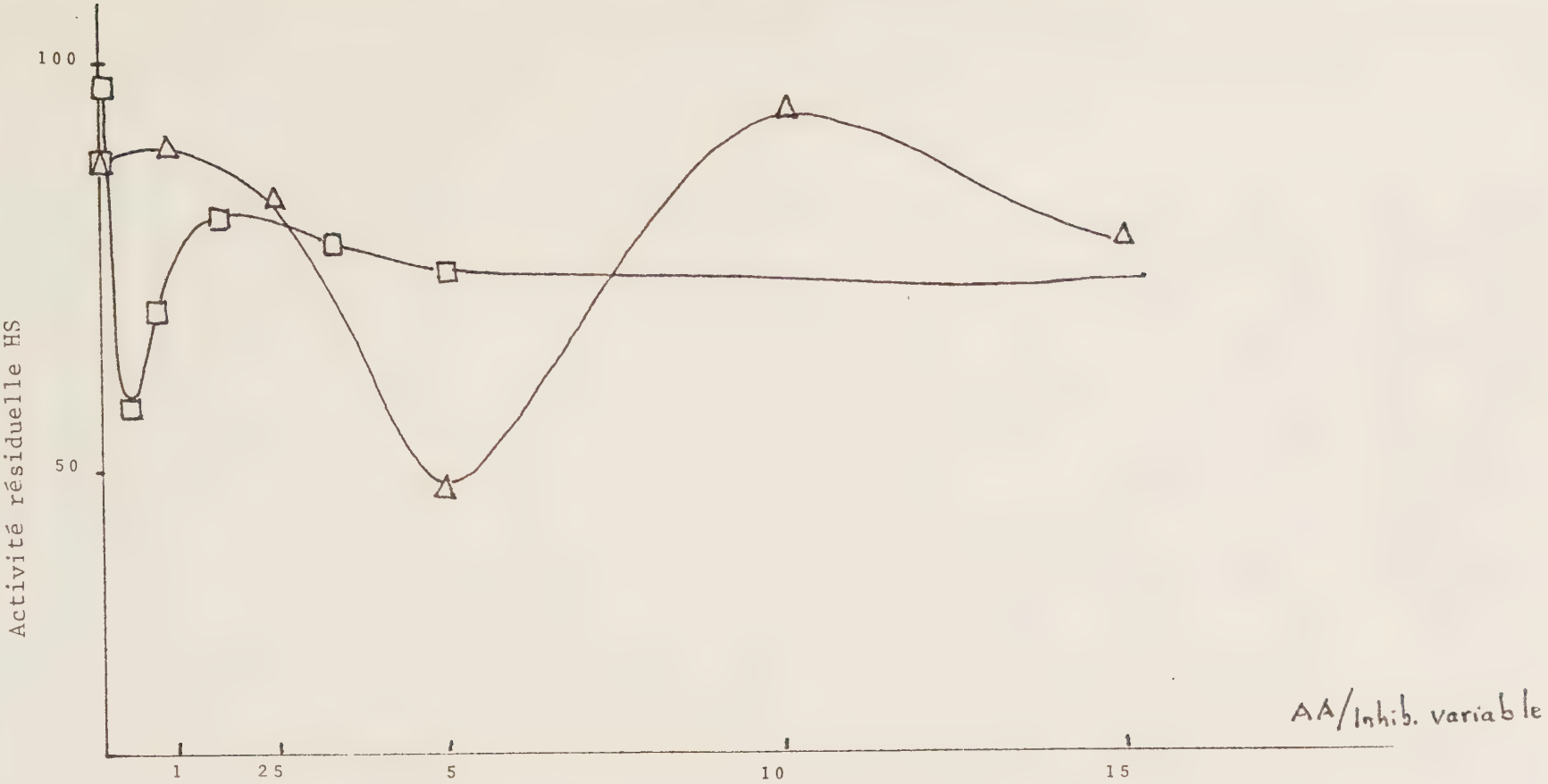
Fig. 29. Recherche d'une inhibition concertée de l'HS par l'αAA et le pipécolate. (W29)

Inhibition de l'HS par différentes concentrations d'αAA seul (○) et en présence de 0,27 mM de pipécolate (□).

On a représenté en pointillé la courbe d'inhibition observée en présence de pipécolate seul.

En pointillé: conditions de la fig.26

Fig. 30 - Recherche d'inhibitions concertées
Souche W29



On a porté les données des fig. 28a et 28b : on a exprimé l'inhibition en fonction des rapports de concentration de l'aminoadipate et de l'inhibiteur fixe;

Δ : $\frac{AA}{LYS}$, □ : $\frac{AA}{Pip}$

de son site propre par l'inhibiteur variable. Cette observation, dont l'interprétation demande confirmation, suggère encore qu'un même inhibiteur peut se fixer sur plusieurs sites d'affinités variables.

L'intérêt physiologique de ces observations n'est pas immédiat dans l'état actuel de nos connaissances sur le métabolisme des intermédiaires ou dérivés de la voie. Il est possible que ce ne soit pas la concentration absolue de ces composés qui soit importante, mais plutôt le rapport de leurs concentrations (voir fig.30). Si dans certaines conditions l'une des étapes comprises entre la lysine et l'aminoadipate devient limitante (carence en ATP ou en glutamate), il y aura élévation de la concentration en aminoadipate. Au delà d'un certain seuil, l'accumulation d'aminoadipate conduirait à un gaspillage d'intermédiaires (α KG, AcCoA): l'inhibition concertée de l'HS par l'aminoadipate en présence de faibles concentrations de lysine serait une réponse appropriée. Dans d'autres conditions, la voie peut servir à produire des dérivés tels que le pipécolate : l'inhibition concertée observée en présence d'aminoadipate et de pipécolate serait logique. Par ailleurs la réversion de l'inhibition due à la lysine par de fortes concentrations d'aminoadipate par exemple permettrait d'assurer ces synthèses même en présence de lysine(?)

c) Etude des conditions de désensibilisation de l'HS aux inhibiteurs non analogues de la lysine

La souche lys12(lys3.12A,lys5.12B) est altérée dans l'aminoadipate réductase.
L'insensibilité de l'HS extraite de la souche lys12 à l'aminoadipate, au pipécolate et au dipicolinate est d'autant plus surprenante qu'on a supposé qu'il existait plusieurs sites de fixation de ces composés sur l'HS. On sait cependant que ces sites sont facilement altérés à l'extraction et que par ailleurs cette souche a un temps de génération très supérieur à celui de la souche sauvage : on peut supposer que l'enzyme extrait de la souche lys12 est désensibilisé à certains

effecteurs pour la même raison qui fait que celui qui provient d'une souche W29 récoltée en phase stationnaire l'est également. Nous n'avons pu définir de milieu où la croissance de lys12 soit normale, ni mettre au point un test in vivo de l'inhibition : en excluant certaines alternatives, nous avons cherché à confirmer indirectement l'hypothèse d'un effet de la croissance (voir tableau 41).

Tableau 41 - Etude des variations de sensibilité de l'HS extraite de différentes souches

Souches	Génotypes	Conditions de culture	Temps de génération	% inhibition par 5mM AA	1mM lys
W29		N5000	2 h.	31	100
		N5000+400 mg/l AA	2 h.	29	100
		N5000 (1)		0	96
lys12	(lys3.12A,lys5.12B)	N5000+75 mg/l lys	7 h.	0	100
lys5	(lys2.5)	"	2 h.30	30	100
lys18	(lys3.18)	"	2 h.30	26	100
2-11	(lys5.12B)	"	2 h.30	28	100
2-18	(lys5.12B)	"	2 h.30	32	100
2-14	(lys3.12A)	"	2 h.30	29	100
2-16	(lys3.12A)	"	2 h.30	28	100
2-12	(lys5.12B,lys6.3)	"	6 h.30	5	100
2-20	(lys3.12A,lys6.3)	"	3 h.	25	100
2-13	(lys3.12A,lys5.12B)	"	7 h.	2	100
2-15	(lys3.12A,lys5.12B)		7 h.30	0	95
2-16	(lys3.12A,lys5.12B,lys6.3)	"	7 h.	6	100
2-17	(lys3.12A,lys5.12B)		7 h.	0	100
2-19	(lys3.12A,lys5.12B,lys6.3)	"	7 h.30	3	96
2-21	(lys3.12A,lys5.12B)	"	7 h.	0	100

(1) Toutes les cultures sont arrêtées vers 4.10^7 cell/ml, sauf W29(1) où les cellules sont prises en phase stationnaire (40 h.)

1. Y a-t-il dérépression d'une seconde activité HS ? cela semble peu probable car les K_m de l'enzyme de lys12 pour ses substrats et la sensibilité à la lysine ne sont pas modifiés par rapport à la souche sauvage.

2. Peut-on supposer qu'il y a accumulation d'un précurseur qui désensibiliserait l'enzyme in vivo (Gray et Bernlohr 1969)? La souche lys12 est accumulatrice d'aminoadipate, il est cependant peu probable que cette accumulation soit directement responsable de la désensibilisation : si on extrait l'HS d'une souche W29 cultivée sur 400 mg/l d'aminoadipate ou d'une souche spontanément accumulatrice d'aminoadipate - comme lys5 ou lys18 - on n'observe pas de désensibilisation. On ne peut cependant pas exclure que, pour certaines raisons, lys12 accumule un produit particulier, différent de l'aminoadipate, responsable de la désensibilisation, par exemple par catalyse d'une réaction chimique qui modifierait certains récepteurs de l'HS, ou rendrait l'enzyme, in vivo ou à l'extraction, plus sensible à des protéases.

3. Est-ce que la modification de l'AAR due à la mutation (lys3.12A) est responsable de la désensibilisation (voir plus haut l'hypothèse d'une inhibition de l'HS par une protéine fixatrice d'aminoadipate) ? On constate dans le tableau 41 que l'enzyme extrait d'une souche (lys3.12A) n'est pas désensibilisé.

4. Y a-t-il une mutation secondaire dans lys12 affectant l'HS ? On voit dans la descendance du diploïde 2 (lys3.12 lys5.12B,+/+,+,lys6.3) que les souches qui apparaissent désensibilisées sont celles qui présentent un temps de génération long : l'hypothétique mutation secondaire n'a qu'une chance sur 128 de n'avoir pas ségrégé. Il semble plus logique de supposer que c'est l'allongement du temps de génération, dû aussi bien à la combinaison (lys6.,lys5

../..

qu'à (lys3., lys5.) qui est responsable de la désensibilisation.

On en déduit que la désensibilisation de l'HS de lys12 et des autres souches peut être due uniquement à l'allongement du temps de génération.

B. Recherche de variations de l'activité spécifique de l'homocitrate synthétase (HS).

On a vu dans le tableau 29 que certains mutants auxotrophes présentaient une activité homocitrate synthétase plus élevée que celle du sauvage. On s'est donc demandé :

- dans quelles conditions on pouvait faire varier cette activité spécifique dans la souche sauvage et dans des souches"déréprimées", type lys12 (lys3.12A,lys5.12B).

- pourquoi certains mutants apparaissaient"déréprimés".

- Quelle était l'importance du dosage génique.

a) Etude des conditions de répression/dérépression dans les souches W29 et lys12.

On a d'abord conduit des expériences préliminaires sur une souche présentant une activité HS élevée : lys12 (lys3.12A, lys5.12B), et sur la souche sauvage. On constate dans le tableau 42 qu'une variation de 0 à 10 mM de la lysine ajoutée dans le milieu est sans effet sur le niveau d'activité de ces souches.

On constate que pour une variation de 600 fois au minimum de la concentration en lysine externe (correspondant à une variation de 10 du "pool" intracellulaire), on n'observe pas après 5 générations de baisse de l'activité HS de la souche sauvage : il est donc probable que, si dans cette souche, l'enzyme est réprimé par la lysine, il l'est déjà sur milieu minimum.

Tableau 42 - Influence de la lysine ajoutée dans le milieu sur l'activité spécifique de l'homocitrate synthétase.

Souches	Age de culture (h)	Poids secs g/l	Lysine initiale mM	Lysine résiduelle (surnageant)mM	Pool de lysine µmoles/g PS.	Activité spécifique de l'HS
W29	17 h.45	2,30	0	< 0,01	24,5	0,033
	17 h.30	2,45	0,5	0,08	38,2	0,035
	17 h.30	2,60	1	0,105	93	0,032
	17 h.	2,50	5	1,78	331	0,035
	17 h.	2,60	10	6,0	356	0,035
lys12	21	1,65	0,5	~ 0,02	22,4	0,097
	21	1,70	1	0,09	81,6	0,092
	20	1,82	5	1,82	321	0,101
	20	1,63	10	6,60	348	0,095

Les souches ont été carencées une nuit sur N_o avant d'être ensemencées sur N5000 supplémenté où on les a arrêtées après 5 générations (6 à 7.10^{-7} cellules/ml)

L'étude de la souche lys12 montre qu'aux concentrations de lysine utilisées, il n'y a aucun effet sur l'apparente "dérépression" de son activité. Cette observation peut signifier soit que la lysine n'est pas le répresseur de l'HS, soit que d'autres phénomènes viennent masquer dans la souche lys12 l'effet de la lysine : accumulation d'intermédiaires activateurs, gènes modificateurs, rôle des deux blocs, etc.. Notons en passant que les cellules lys12 qui ont poussé sur N5000 supplémenté par de la lysine 5 ou 10 mM n'accumulent plus d'α aminoadipate; cet effet est sans doute du à une inhibition par la lysine de l'homocitrate synthétase *in vivo*. Il indique par ailleurs que la"dérépression" mesurée dans lys12 n'est probablement pas due (ou pas uniquement) à l'accumulation d'α aminoadipate. Avant d'aborder plus en détail les problèmes que posent les mutants "déréprimés", nous allons d'abord étudier rapidement l'effet de différentes

modifications du milieu sur le niveau d'activité de l'HS.

On a supplémenté un milieu N5000 en acides aminés (leucine, proline, arginine, glutamate), en produits éventuels du catabolisme de la lysine (cadavérine, N-6-acétyllysine, 5-aminovalérate, glutarate), en intermédiaires ou dérivés possibles de la voie (aminoadipate, pipécolate, dipicolinate seuls ou avec la lysine) : on n'observe pas de variations de l'activité spécifique HS des souches lys14 (lys3.14A,lys4.14B lys12 (lys3.12A,lys5.12B) ou de W29 (composés ajoutés à 10 mM (voir tableau 43)

On a essayé de déréprimer l'activité de W29 en cultivant cette souche sur différentes sources de carbone ou d'azote (voir tableau 43). Il faut noter que sur acétate ou paraffine qui sont d'assez mauvaises sources de carbone, le "pool" de lysine intracellulaire de W29 est inférieur à ce qu'il est sur glucose, sans qu'il y ait dérépression de l'HS.

On peut donc supposer que dans tous les cas, la souche W29 accumule un "pool" suffisant du ou des répresseurs de la voie et que dans ce cas, la répression de l'homocitrate synthétase est maximum.

b) Etude de l'effet de mutations d'auxotrophie pour la lysine sur l'HS

Des résultats rapportés dans le tableau 29, on avait conclu que tous les mutants AAR$^-$, et ceux-ci uniquement, présentaient un niveau d'activité de l'HS supérieur au sauvage. Le fait que ces mutants aient été isolés dans des souches sans rapport entre elles semblait exclure a priori l'intervention de gènes modificateurs secondaires de l'HS.

Pour préciser les conditions de "dérépression" de l'HS dans des auxotrophes lys$^-$, différentes combinaisons de mutations ont été testées (voir tableau 44)

Tableau 43 - Recherche de variations de l'activité spécifique de l'homocitrate synthétase

Milieu testé (10^{-2}M)	Pool lysine (W29)	Activités spécifiques		
		W29	lys12	lys14
N5000 (1)	34	0,033	0,105	0,096
+ leucine		0,028	0,104	0,094
+ proline		0,035	0,095	0,098
+ arginine		0,031	(2)	(2)
+ glutamate			0,097	
+ cadavérine		0,034		0,095
+ N-ε-acétyllysine		0,037		0,102
+ 5-aminovalérate		0,032		0,092
+ glutarate		0,033		0,088
+ aminoadipate				0,096
+ pipécolate				0,095
+ dipicolinate				0,092
+ aminoadipate + lysine		0,028		0,091
+ pipécolate + lysine		0,029		0,088
+ dipicolinate + lysine		0,035		0,103
C_o + lysine 10 g/l	285	0,031	0,109	
C_o + glycérol 10g/l	36	0,030	0,106	
C_o +CH_3COOK 10 g/l	17	0,034		
C_o + C_{16} 8 g/l	20	0,035	0,112	0,096
N_o + Pro 1 g/l		0,034		
N_o + Glu 1 g/l		0,032		

(1) Tous les milieux sont supplémentés par 5.10^{-4}M lysine pour lys12 et lys14.

(2) lys12 et lys14 ne poussent pas en présence d'arginine 10^{-2}M et de lysine 5.10^{-4}M.

Tableau 44 - Effets de mutations lys⁻ sur l'activité de l'HS

Souches (génotypes)	Activité spécifique de l'homocitrate synthétase (1)	Activité spécifique de l'AA réductase (2)
W29	0,033	10
2-14 (+, lys3.12A, +)	0,096	0
2-15 (+, lys3.12A, lys5.12B)	0,103	0
2-19 (lys6.3,lys3.12A,lys5.12B)	0,098	0
2-20 (lys6.3, lys3.12A, +)	0,036	0
2-2 (lys6.3, +, +)	0,034	9,5
2-18 (+, +, lys5.12B)	0,034	10
2-12 (lys6.3, +, lys5.12B)	0,078	10
4304-3 (+, +, lys4.14B)	0,033	8,5
1402-1 (lys6.3, +, lys4.14B)	0,068	11

(1) Conditions de dosage standard : 50 mM α KG, 2 mM AcCoA)

(2) Conditions de dosage : activité réductase à 340 nm.

On constate que deux types de mutants sont déréprimés :

- ceux qui sont altérés uniquement dans l'AAR (voir tableau 29 et 2-14 ici)
- Ceux qui portent un double bloc avant et après l'AASA (2-15, 2-19, 2-12 et 1402-1).

On en conclut que l'accumulation d'α aminoadipate dans une souche incapable de le transformer en AASA joue le même rôle qu'un ensemble de mutations qui empêchent la formation de l'AASA à la fois de novo et à partir de la lysine (ces dernières associations produisent par ailleurs les phénotypes "lent" et "HS insensible à l'AA" - voir tableaux 39 et 41 -).

Pour une raison à déterminer, l'accumulation d'AA mime une carence en AASA (ou en ses dérivés). Il est important de noter

- que si on introduit un bloc précoce dans une souche AAR⁻ (lys3.par exemple) pour empêcher l'accumulation de l'AA, n'empêche pas la formation d'AASA : la souche n'est pas "déréprimée" - voir 2.20 (lys6.3,lys3.12A). Le même bloc précoce n'a aucun effet sur un double mutant (lys3.12A, lys5.12B). Ce n'est donc pas l'accumulation d'AA qui "déréprime" l'HS (voir § précédent).

- que certains doubles mutants comme 2-12(lys6.3,lys5.12B) et 1402-1 (lys6.3, lys4.14B), qui ont une activité AAR normale mais ne peuvent régénérer l'AASA, sont "déréprimés" : il n'y a pas effet direct de l'activité AAR sur l'activité HS.

- que l'augmentation du temps de génération ne suffit pas seule à "déréprimer" l'HS : la souche (lys3.12A) a un temps de génération normal et est "déréprimée (comme tous les mutants des loci (lys2.) et (lys3.).

Ces observations suggèrent que l'effet de "dérépression" de l'HS observé est dû à une carence en AASA ou en ses dérivés. Cet effet est maximum dans les souches (lys3.), (lys3., lys4.) ou (lys3., lys5.), il est un peu moins prononcé dans les souches (lys6., lys4.) et (lys6., lys5.) : en l'absence d'informations sur l'existence d'une voie secondaire de régénération de l'AASA (activité lysine- α cétoglutarate aminotransférase), nous ne pouvons pas juger de l'importance de cette observation.

c) Effet de la lysine sur les mutants "déréprimés".

On a vu au § a),que la lysine était sans effet sur l'activité HS des souches W29 et (lys3.12A,lys5.12B). On s'attend cependant à observer un effet dans une souche (lys3.12A), si la lysine peut remplacer un bloc précoce et diminuer l'accumulation de l'AA. L'hypothèse énoncée au § précédent d'un rôle

de l'AASA ou d'un dérivé de ce produit prédit en effet que (voir tableau 45) :

- on peut"réprimer"l'HS d'une souche (lys3.) ou lys2.) en la cultivant sur de grandes quantités de lysine ; l'effet sera moins important dans une souche (LYS1.5, lys3.).

- on ne peut pas "réprimer" l'HS d'une souche incapable de régénérer l'AASA (lys3., lys5.), (lys3., lys4.), lys6.,lys5.) en la cultivant sur lysine.

- on doit "déréprimer" l'HS d'une souche (lys4.) ou (lys5.), si l'addition de lysine revient à limiter l'activité de la partie précoce de la voie.

On constate que les deux premières prédictions sont vérifiées, mais pas la 3è. Il faut remarquer cependant qu'on ne peut pas affirmer que dans les souches (lys5.) et (lys4.) l'inhibition de l'homocitrate synthétase par la lysine est totale in vivo il peut y avoir une synthèse résiduelle des précurseurs suffisante pour assurer la formation d'AASA. Par ailleurs on ne connaît pas l'activité lysine α cétoglutarate aminotransférase de ces souches.

Il serait donc hasardeux de proposer un schéma de régulation de l'HS sur la base de ces résultats, en particulier parce que

- on ignore le rôle exact de la mutation (lys6.) utilisée.

- on n'a pas pu tester directement l'effet de l'αAA sur une souche non déréprimée (on ne peut pas accumuler de fortes concentrations d'α AA exogène).

- on n'a pas encore identifié de dérivé possible de l'AASA, ni mesuré les "pools" d'AASA.

- on ne sait rien sur l'activité lysine α KG aminotransférase.

- on ne sait pas ce qui se passerait dans une souche dont le "pool" de lysine serait inférieur à celui du sauvage sur N.5000.

Tableau 45 - Effet de la lysine dans des souches lys⁻ sur l'activité HS

Souches (génotypes)	Conditions de culture	Activité spécifique HS (1)	Activité spécifique AAR (2)
(lys3.12A)	N5000 + 0,5 mM lys	0,107	0
	+ 1 mM lys	0,091	
	+ 5 mM lys	0,062	
	+ 10 mM lys	0,041	0
(lys2.5)	N5000 + 0,5 mM lys	0,094	0
	+ 1 mM lys	0,092	
	+ 5 mM lys	0,051	
	+ 10 mM lys	0,039	0
(LYS1.5, lys3.12A)	N5000 + 0,5 mM lys	0,112	0
	+ 1 mM lys	0,108	
	+ 5 mM lys	0,089	
	+ 10 mM lys	0,081	0
(lys3.14A, lys4.14B)	N5000 + 0,5 mM lys	0,094	≃ 0
	+ 1 mM lys	0,097	
	+ 5 mM lys	0,092	
	+ 10 mM lys	0,096	≃ 0
(lys6.3, lys5.12B)	N5000 + 0,5 mM lys	0,076	9,5
	+ 1 mM lys	0,068	
	+ 5 mM lys	0,073	
	+ 10 mM lys	0,071	10
(lys5.12B)	N5000 + 0,5 mM lys	0,031	9,5
	+ 5 mM lys	0,033	
	+ 20 mM lys	0,030	
(lys4.14B)	N5000 + 0,5 mM lys	0,034	10
	+ 5 mM lys	0,028	
	+ 20 mM lys	0,032	

(1) Conditions de dosage : 1 mM AcCoA 50 mM α KG

(2) En nmoles $NADPH_2$ / mn / mg protéines.

A titre d'hypothèse de travail, on peut envisager que le corépresseur de l'HS ne soit pas la lysine seule, mais la lysine + l'AASA ou un dérivé. Ce 2ème corépresseur serait formé à partir de la lysine dans les mutants précoces (réversibilité des dernières étapes de la voie) et de novo dans les mutants tardifs, sauf dans ceux qui accumulent l'aminoadipate (ou un de ces précurseurs). L'aminoadipate serait donc indirectement impliqué dans le contrôle de l'HS en agissant soit sur un des derniers enzymes de la voie, soit, ce qui paraît plus probable parce qu'aucun effet de ce genre n'a été observé, sur la régénération de l'AASA par la lysine α cétoglutarate aminotransférase. Nous essaierons de discuter, à la fin de ce chapitre, quel intérêt pourrait présenter ce type de régulation.

d) Variations de l'activité spécifique en fonction de la croissance

L'étude de ces variations est restée préliminaire. On a précultivé les souches à tester sur N_o puis on les a transférées sur N5000 (supplémenté en lysine 5.10^{-4}M pour le mutant auxotrophe) et on a arrêté les cultures à différents moments de la croissance (voir tableau 46).

Tableau 46 - Variations de l'activité homocitrate synthétase au cours de la croissance

Souches	Temps de culture (1)	Nbre de cellules/ml		Activité spécifique homocitrate synthétase (2)	
W29	6 h.	$4,2.10^6$		0,032 (2)	
	12 h.	$2,3.10^7$		0,038	
	17 h.	$9,5.10^7$		0,038	
	32 h.	$12,5.10^7$		0,034	
lys12	8 h.	$4,9.10^6$	$5,2.10^6$	0,057 (2)	0,124 (3)
(lys3.,lys5.)	24 h.	3.10^7	$2,5.10^7$	0,096	0,188
	34 h.	$5,1.10^7$	$5,3.10^7$	0,103	0,237
	56 h.	$7,6.10^7$	$7,1.10^7$	0,099	0,189

(1) Le premier point est fait en fin de lag, (ensemencement avec 4.10^6 cellules/ml

(2) Dosage dans les conditions standard (50mM αKG, 2mM AcCoA)Protéines déterminées par la méthode de Lowy (2) et par le biuret (lys12) (3) dans ce dernier cas, l'activité du sauvage est voisine de 0,065.

On constate que si l'activité du sauvage ne varie pas beaucoup, celle de lys12 varie presque du simple au double. Les cellules carencées en ammonium ont une activité variable et inférieure à 0,009 ΔdO/mn/mg de prot.(Lowy). Les conditions de dérépressio de lys.12 ne pourront être étudiées qu'en chémostat.

e) Etude de l'effet des dosages géniques

L'approche des mécanismes de régulation d'une activité par l'étude quantitative de ses variations en culture dans différents milieux (éventuellement en chémostat) est limitée par la perméabilité cellulaire ou/et la possibilité de transformation en dérivés métaboliques de produits ajoutés aux milieux. Cette limitation peut être tournée de deux façons : par l'étude des dosages géniques ou par l'emploi de mutants leaky (Barthelmess et al.1974). Seule la première approche a été utilisée ici de façon préliminaire. Dans le cas simple d'enzymes monomériques constitutifs ou complètement déréprimés, on attend une stricte proportionnalité entre le dosage génique et le niveau d'activité spécifique mesuré (Ciferi et al.1969, Slonimski et al.1965). Le problème est plus compliqué dans le cas des enzymes oligomériques s'il y a complémentation intra-allélique : la relation simple ci-dessus n'est vérifiée que dans les cas où les monomères mutants et sauvages ne s'agrègent pas, ou si les hybrides formés ont une activité spécifique proportionnelle à la part sauvage. Dans le cas contraire, on observera des déviations par rapport à cette relation : pour la thréonine déshydratase de *S. cerevisiae* (gène is1, Zimmermann et al (1969 ont trouvé pour 16 diploïdes is1/+ 50% de l'activation du diploïde +/+, pour 9, moins de 50% et pour 7, plus de 50%.

Dans le cas des diploïdes(lys1./+), on s'attend à être dans ce dernier cas. Mais si l'HS est une étape limitante de la voie dont le niveau est régulé par l'un des dérivés des étapes ultérieures, on s'attend à observer dans tous les cas une activité supérieure à 50% de celle d'un témoin (LYS1.$^{+}$/LYS1.$^{+}$), et, si la dérépression de l'allèle sauvage n'est pas suffisante pour restaurer une activité voisine du témoin, un effet sur le "pool" de lysine (et éventuellement la croissance). Si par contre on

observe des valeurs inférieures à 50% du témoin pour un "pool" de lysine et une croissance identiques, on en déduira que le niveau d'activité spécifique de l'HS dans l'haploïde est au moins deux fois supérieur aux besoins de la cellule et que vraisemblablement l'enzyme n'est contrôlé que par rétroinhibition.

On a mesuré l'homocitrate synthétase de diploïdes (lys1/+)et(lys lys3/+,lys3.) afin d'étudier l'effet du dosage génique sur les mécanismes de régulation supposés. On a ensuite recherché si l'effet de (lys3.) sur la répression de l'homocitrate synthétase était récessif. Les résultats sont rapportés dans le tableau 47.

Tableau 47 - Activité spécifique de l'homocitrate synthétase dans des diploïdes (lys1/+)

Conditions standard de dosage (50 mM αKG, 2 mM AcCoA)

Souches	Activité spécifique HS	Pool de lysine intracellulaire µM/g PS	Temps de génération approximatif(N5000)
W29 (+)	0,033	23	2 h.
(lys1.1/+)	0,043	22	2 h.
(lys1.7/+)	0,038	19	2 h.
(lys1.8/+)	0,044	23	2 h.
(lys1.10/+)	0,041	21	2 h.
(lys3.12A+/lys3.12A,+)	0,118	18	
(lys3.12A,lys1.1/lys3.12A,+)	0,109	19	
(lys3.12A,lys1.8/lys3.12A,+)	0,115	21	
(lys1.13/+)	0,014	22	4 h.
(lys3.12A,lys1.13/lys3.12A,+)	0,017	20	
(lys3.12A/+)	0,060	21	2 h.
(lys2.5/+)	0,058	22	2 h.
lys3.18/+)	0,061	20	2 h.
(+/+)	0,044	24	2 h.

../..

On constate que le diploïde sauvage et les diploïdes hétérozygotes (lys1./+) ne faisant pas intervenir (lys1.13) ont une activité voisine, supérieure de 15 à 30% à celle de l'haploïde W29, pour un "pool" de lysine inchangé. On peut considérer qu'il y a eu dérépression de l'homocitrate synthétase dans les hétérozygotes (on a vérifié que ces hétérozygotes ségrégeaient bien après méiose 50% de descendants lys^-). La "dérépression" produite par (lys3.) est équivalente à ce qu'elle est dans un haploïde (facteur 3/hétérozygote ($LYS3^+$)). On en conclut que le niveau de dérépression de l'HS mesuré dans un haploïde (lys3. n'est pas le niveau maximum.

On voit que les hétérozygotes (lys1.13/+) ont un temps de génération plus long que les autres, et une activité moitié moindre de celle de W29. On peut alors supposer que l'augmentation du temps de génération ne fait que traduire l'abaissement du niveau de l'homocitrate synthétase : il faut attendre plus longtemps pour que la lysine synthétisée atteigne un niveau suffisant pour que la division se fasse (les "pools" de (lys1.13/+) et de (+/+) sont voisins). Cette hypothèse est confirmée par l'observation que l'aminoadipate et la lysine restaurent un temps de génération normal (voisin de 2 h. à 100 mg/l de ces composés). La baisse d'activité spécifique peut être due à une déstabilisation des molécules d'enzymes contenant une sous-unité altérée (complémentation négative in vivo ou sensibilité à l'extraction). L'absence de dérépression dans les diploïdes (lys3.12A,+/lys3.12A,lys1.13) pourrait être due à une accumulation insuffisante d'aminoadipate si sa formation est limitée par la quantité d'homocitrate synthétase active : on n'observe effectivement pas par chromatographie, d'accumulation de cet acide aminé. Ce phénomène semble confirmer la réalité d'une baisse de l'activité homocitrate synthétase in vivo. On verra plus loin que cet effet de(lys1.13) se manifeste également dans les diploïdes (LYS1.5/lys1.13) : (LYS1.5) y apparait récessif alors qu'il est semi dominant dans les diploïdes (LYS1.5/+) ou (LYS1.5/lys1.10). Cette déstabilisation pourrait éventuellement être confirmée par une étude cinétique de l'enzyme extrait de diploïdes hétérozygotes pour (lys1.13).

On constate par ailleurs que les mutations (lys2.) et (lys3.) testées ont un effet semi-dominant sur la dérépression de l'homocitrate synthétase. Les diploïdes (lys3.12A/+), (lys2.5/+) et (lys3.18/+) ont un temps de génération et un pool de lysine voisin de celui du sauvage, indiquant qu'ils n'ont pas de besoin en lysine, mais leur activité spécifique AAR est réduite de 50% environ par rapport au sauvage (voir ci-dessus tableau 38). C'est peut-être cette réduction partielle de l'activité AAR qui, en provoquant une accumulation d'α aminoadipate, tout en assurant une production suffisante de lysine, est responsable de la dérépression partielle de l'homocitrate synthétase.

Conclusion

L'homocitrate synthétase de *S. lipolytica* semble soumise à un ensemble complexe de mécanismes régulatoires comprenant :

- une rétroinhibition par la lysine , l'aminoadipate et des composés peut-être dérivés de la voie.

- un contrôle du niveau de l'activité spécifique, plus ou moins directement par l'AASA. On n'a obtenu aucune indication sur un effet direct de la lysine à ce niveau, mais cette possibilité ne peut être exclue.

Le mécanisme de régulation proposé n'a pas encore pu être testé directement,parce qu'aucune des souches actuelles ne forme de "pool" élevé d'AA quand on cultive les cellules en présence de ce composé. L'étude du transport de l'AA actuellement poursuivie et l'obtention de souches "AA utilisatrices" ou "AA sensibles" présentent un double intérêt:

- vérifier certaines hypothèses, par exemple on doit pouvoir "déréprimer" l'homocitrate synthétase d'un diploïde (lys1.13, lys3.12A/+ ,lys3.12A) en lui faisant accumuler de l'aminoadipate externe, "réprimer" une souche (lys6., lys5.) en lui fournissant de l'AA.

- rechercher un effet toxique de l'α aminoadipate si celui-ci inhibe la formation d'un dérivé essentiel de la voie : une

souche (lys3.,lys4./+, lys4.) qui pousse normalement sur lysine serait peut-être inhibée par l'α aminoadipate. Plus généralement l'obtention de souches sensibles à l'aminoadipate permettrait peut-être de préciser le rôle de ce dernier.

C. Etude des variations d'activité spécifique de la saccharopine déshydrogénase

Par des études in vivo, Tucci et Ceci (1972b) avaient proposé que chez *S. cerevisiae*, l'essentiel de la régulation de la voie par la lysine soit concentré sur la deuxième partie de la chaîne, après l'aminoadipate. Bien que cette observation ne semble pas s'appliquer au cas de *S. lipolytica* (voir l'effet d'une mutation type(LYS1.5)), il était important de s'assurer du rôle de la lysine sur les enzymes concernés. On a vu plus haut qu'en dehors d'une inhibition par la lysine de la saccharopine déshydrogénase, on n'avait pas réussi à démontrer un effet de cet acide aminé sur l'activité des derniers enzymes de la voie. L'étude des mutants auxotrophes n'avait pas non plus révélé des variations significatives d'activité spécifique. Comme tous ces mutants on un "pool" de lysine libre voisin du sauvage,il fallait d'abord vérifier que les niveaux d'activité dosés ne correspondaient pas à un niveau de répression maximum.

a) Effet de divers composés sur l'activité des derniers enzymes de la voie

La souche W29 a été précultivée une nuit sur N5000 tamponné puis transférée sans lavage en phase exponentielle sur le même milieu supplémenté. On lui laisse effectuer 6 à 7 générations et on centrifuge les cellules quand la densité atteint 6 à 7.10^7 cellules/ml. Les 3 activités AAR, AASAGR et SDH sont dosées sur le même extrait, après une nuit de dialyse (voir tableau 48).

On voit qu'aucun des acides aminés testés n'a d'influence significative sur l'AAR et sur l'AASAGR. On a vérifié l'absence d'un effet de la lysine, de l'aminoadipate et du pipécolate (tous 5.10^{-3}M) sur le niveau d'activité de l'AAR en dosant cette activité par le pDMABA (noter cependant que l'AA et le

Tableau 48 - Effet de divers composés sur l'activité spécifique des derniers enzymes

Acide aminé ajouté		Activités spécifiques (nmoles coenzyme/mn/mg prot.)		
		AAR	AASACR	SDH
0		10	20,9	365
lysine	10^{-3} M	10,5	19,9	237
aminoadipate	5.10^{-3} M	10	18,3	381
pipécolate	5.10-3 M	10,4	21,5	376
thréonine	5.10-3 M	10,1	18,6	354
leucine	5.10-3 M	11,2	19,9	362
arginine	5.10-3 M	9,75	20,5	381
ornithine	5.10-3 M	9,80	20,4	372
méthionine	5.10-3 M	10,2	19,4	373
glutamate	5.10-3 M	10	20,5	358
cadavérine	5.10-3 M	10	21,2	356
N-ε-acetyllysine	5.10-3 M			347
5-aminovalérate	5.10-3 M			368
L-lysine hydroxamate	5.10-3 M			284

On observe par contre un effet de la lysine et de son analogue toxique, la L-lysyl hydroxamate sur l'activité spécifique de la SDH (35% de réduction pour 1 mM lysine). Les autres analogues non toxiques testés (ornithine, N-6-acétyllysine) n'ont pas d'effet. On n'a pas pu tester l'effet des trois analogues toxiques de la lysine (4,5-transdéshydrolysine, (amino-3) cyclohexylalanine et S-aminoéthylcystéine) : la souche W29 est inhibée par des concentrations inférieures à 10^{-4}M. Cette expérience pourrait être conduite sur une souche mg-5 (LYS1.5)

b) Effet de la lysine sur la saccharopine déshydrogénase

Pour vérifier si l'effet observé avait une signification physiologique, on a essayé d'établir une corrélation entre l'activité spécifique de la SDH et la taille du "pool" de lysine intracellulaire. Celle-ci peut être accrue en ajoutant de la lysine au milieu de culture, la taille maximum du "pool" de la

souche sauvage est atteinte autour de 5.10^{-3}M. On a essayé d'agir sur cette taille "maximum" en utilisant des souches qui ne catabolisent plus la lysine. On verra dans la 4ème partie qu'on peut admettre que le catabolisme de la lysine passe par la N-6-acétyllysine (1ère étape), qui est ensuite transformée en 5-aminovalérate. Deux types de mutants sont incapables de catalyser la première étape (lysine acétyl transférase?): ceux du locus(lyc1.) qui est très lié au "gène de structure" de la SDH (lys5.), et ceux des loci (lyc3.), (lyc4.), (lyc5.). Ces derniers sont cependant capables de catalyser la transformation de la lysine en N-6-acétyllysine si on leur fournit du 5-aminovalérate, qui apparaît comme un inducteur.

Sur la fig.31, on voit que l'activité SDHde la souche W29 est "réprimée"par la lysine, tandis que ce phénomène disparaît complètement dans les souches lyc1 (lyc3.1) et lyc5 (lyc1.5): dan ce dernier cas on observe de plus une grande dispersion des valeurs et une diminution de l'activité spécifique. On peut supposer que le répresseur de la SDH n'est pas la lysine, mais un produit de sa dégradation, non formé dans les souches lyc1 et lyc5. On a donc testé la répression de la SDH par la N-6-acétyllysine dans les souches lyc1 (lyc3.1), lyc18 (lyc4.18) et lyc22 (lyc5.22) en espérant que les intermédiaires répresseurs s'accumuleraient dans ces souches. Comme on le voit dans le tableau 49, on n'observe aucune répression, ce qui est en accord avec les résultats obtenus pour la N-6-acétyllysine sur W29 (tableau 48)

Il faut noter que toutes les souches lyc$^-$ "insensibles" à l'effet répresseur de la lysine sont celles qui sont altérées dans la transformation de la lysine en N-6-acétyllysine (lysine acétyl transférase$^-$ - ou LAT$^-$-). On peut penser que c'est cette altération elle-même qui modifie la sensibilité de la SDH à la lysine.

On verra dans la 4ème partie que la perte de l'activité "lysine acétyltransférase" dans la souche lyc1 est vraisemblement due à une absence d'induction : on peut la restaurer

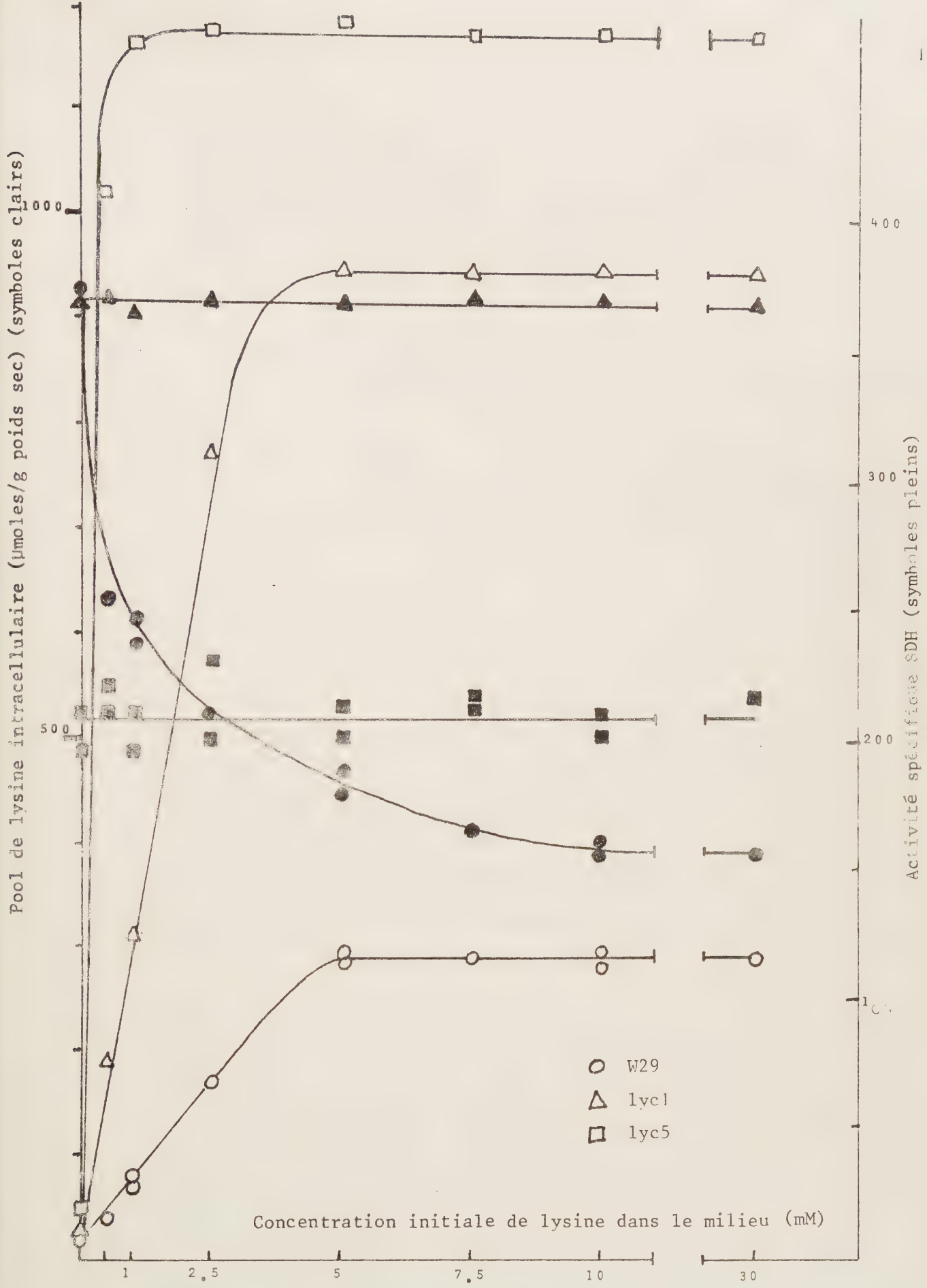


Fig. 31 – Evolution de l'activité spécifique SDH et du pool de lysine intracellulaire en fonction de la concentration de lysine ajoutée au milieu N5000

Les cultures sont ensemencées à partir d'une préculture N5000 tamponnée; elles sont arrêtées quand leur densité atteint 7 à 7,5.10^7 cellules/ml.

en cultivant le double mutant (lyc3.1, lyc6.44) sur 5-aminovalérate. On a donc recherché si la SDH de ces doubles mutants était réprimée en présence de lysine quand l'activité lysine acétyltransférase était induite. On constate dans le tableau 49 que la répression de la SDH réapparaît quand le premier enzyme du catabolisme est "induit".

Tableau 49 - Recherche d'une répression de la SDH dans les mutants du catabolisme

Souche testée	NAL (pool) (2)	Activité spécifique (nmoles $NADH_2$/min/mg prot.)s. N5000 (1)								
		0	lys0,5	lys1	lys2.5	lys5	lys10	NAL1	NAL5	NAL10
lyc1 (lyc3.1)	-	363		354		369		369	373	352
lyc18 (lyc4.18)	-	356		366		361		360	362	351
lyc22 (lyc5.22)	-	371		354		366		358	364	371
lyc44 (lyc6.44)	+	369	258	244	218	184	172			
(lyc3.1, lyc6.44)	-	367	364	370	352	359	361			
(lyc3.1,lyc6.44) (3)	+	361	197	182	157	164	159			

(1) Milieu tamponné supplémenté par les concentrations indiquées (mM) de lysine ou de N-acétyllysine (NAL)

(2) On recherche par chromatographie, la présence de NAL dans le pool des cellules cultivées sur N5000+ 5 ou 10 mM lysine

(3) Souche cultivée sur les milieux décrits, tous supplémentés par 50 mg/l 5-aminovalérate.

On a étudié sur la souche W29 la cinétique de disparition de l'activité SDH après addition de lysine à un milieu de culture N5000. La souche a été précultivée une nuit sur N5000 tamponné à pH 5,0 et transférée en phase exponentielle sur du milieu frais N5000 tamponné. 4 h. après le transfert, on a ajouté la lysine 10 mM à une série de cultures parallèles qu'on a arrêtées à des temps variés en les versant sur de la glace pilée et en les centrifugeant à 0°C avant de les broyer. Sur chaque fraction on détermine la densité cellulaire, la taille du "pool" de lysine (une chromatographie des extraits sert à détecter l'apparition de N-6-acétyllysine) et l'activité SDH (voir fig.32a).

.../...

Après une période de lag de 30 min environ pendant laquelle le pool de lysine s'accroît, on observe simultanément: un ralentissement de l'accroissement du pool de lysine puis une chute de celui-ci vers 2 h., une apparition de N-ε-acétyllysine caractéristique du catabolisme de la lysine et une chute rapide de l'activité spécifique de la SDH: celle-ci est réduite de moitié en une génération, comme s'il y avait eu arrêt brutal des synthèses et dilution de l'activité préexistante. Ce résultat est encore plus net si on représente l'activité SDH totale présente dans la culture au cours de la croissance (fig. 32 b). On n'observe pas de perte d'activité.

Ce phénomène peut avoir deux explications au niveau de l'expression du gène de la SDH, si on admet qu'on n'a pas activé la protéolyse ou inactivé spécifiquement la SDH préformée:

-le messager de la SDH a une durée de vie brève, et l'addition de lysine a stoppé net (directement ou non) sa synthèse Cybis et Weglenski (1972), Lawther et Cooper (1973, 1975) ont décrit chez *S. cerevisiae* des messagers dont la demi-vie n'excède pas 3 min; dans ce cas on n'aurait plus au bout de 15 mi qu' $1/64^{e}$ des messagers présents au temps zéro de l'expérience et on assisterait seulement à la dilution de la SDH.

-le messager a une durée de vie longue, de l'ordre de 20 mi (Tønnesen et Friesen 1973, Surdin Kerjan et de Robichon-Szulmajster 1975) et une synthèse résiduelle de SDH doit persister: on observera, si la lysine bloque les nouvelles synthèses, un amortissement de l'augmentation d'activité totale (diminution par 2 toutes les 20 min par exemple du taux d'accroissement de l'activité totale). Comme ce n'est pas ce qu'on observe, il faut supposer dans cette hypothèse qu'il y a régulation au niveau de la traduction. Il est séduisant dans cette hypothèse d'imaginer que c'est la synthèse de la LAT induite qui empêche celle de la SDH à cause: 1) du parallélisme de l'apparition d'une activité catabolique et de la disparition de la SDH; 2) de l'effet des mutations lyc^{-}.

Il est clair que d'autres expériences seraient nécessaires pour pouvoir formuler une interprétation convaincante des phénomènes observés; on retiendra de celles qui sont présentées ici en première analyse l'addition de lysine à une culture exponentielle de la souche sauvage résulte en une diminution de l'activ

Fig. 32a Cinétique de répression de la SDH par la lysine 10 mM.

La lysine est ajoutée au temps 0. Témoin sans lysine en pointillé. Pool (●) et activité spécifique SDH (△

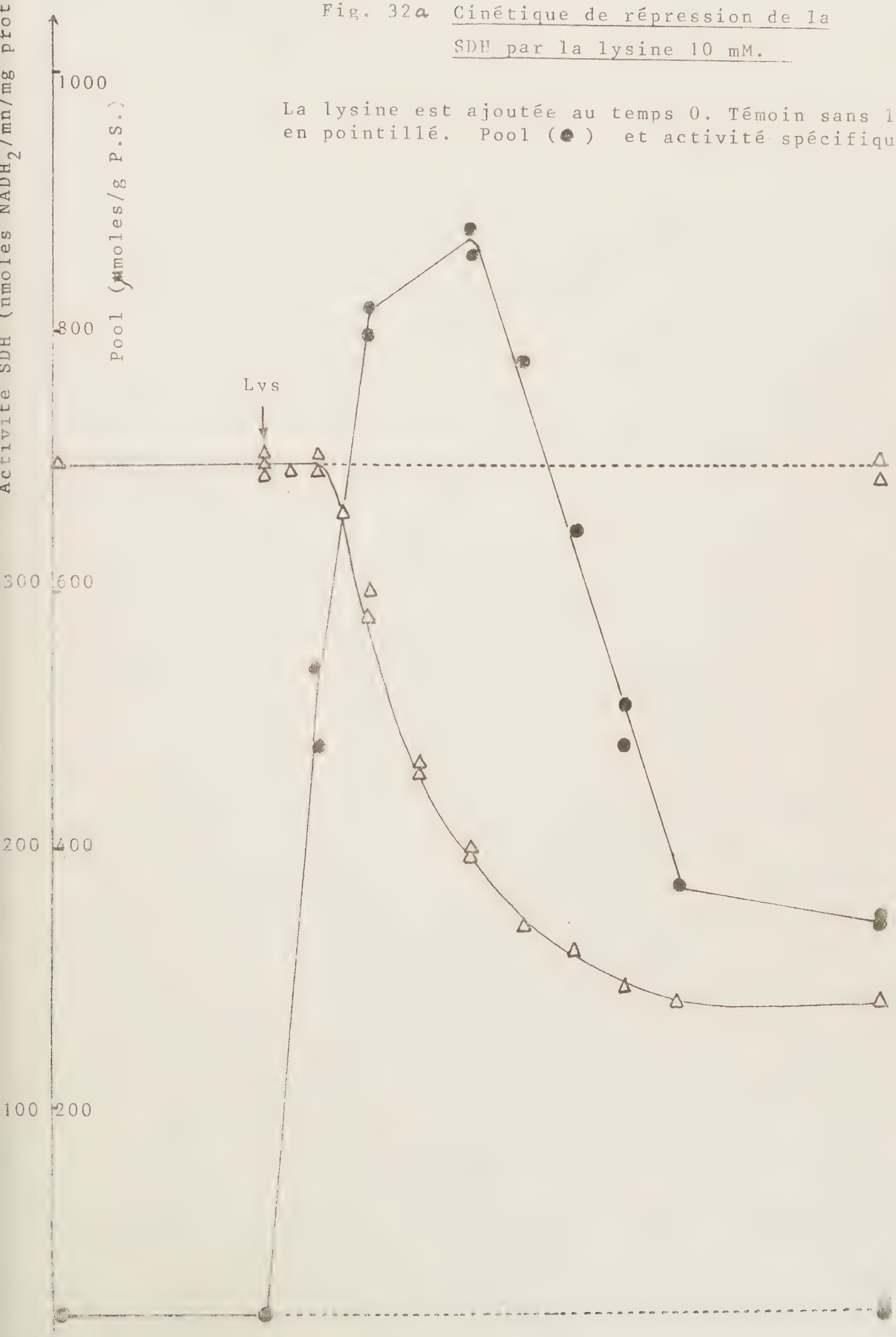
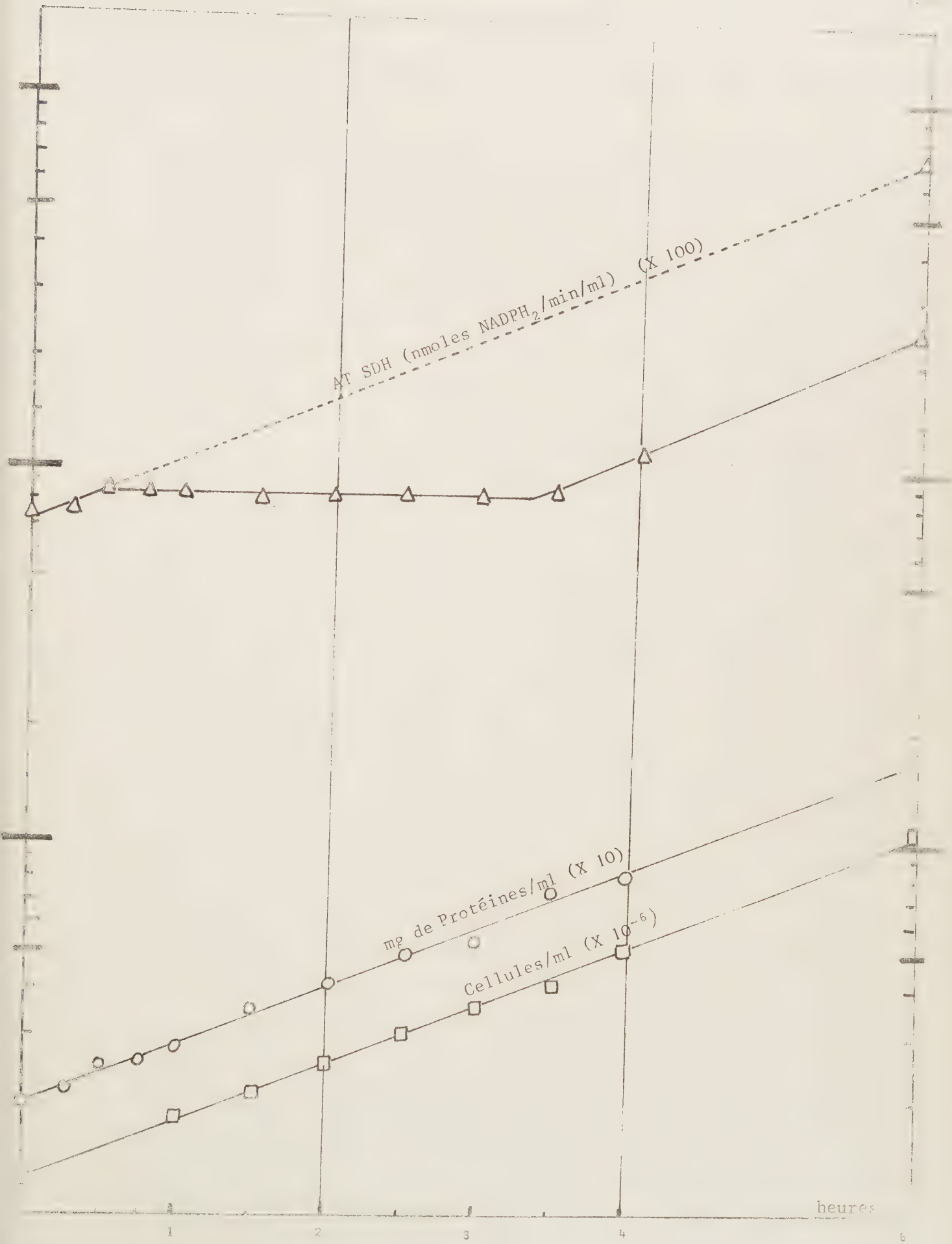


Fig. 32b - Répression SDH par 10 mM lys



La lysine est ajoutée au temps 0 à une culture de W29 en croissance exponentielle; témoin sans lysine (----------). On a représenté en coordonnées semi-logarithmiques l'évolution du nombre de cellules, du contenu protéique et de l'activité totale SDH présente dans la culture

spécifique de la SDH qui présente certaines des caractéristiques d'une répression.

Conclusion. On observe une apparente répression de la SDH quand on cultive une souche sauvage sur un milieu supplémenté en lysine. Cette répression est abolie dans une souche qui ne peut catalyser la conversion de la lysine en N-ε-acétyllysine, dite LAT$^-$ pour simplifier. Nous avons favorisé l'hypothèse d'une action directe de la LAT sur l'expression du gène de la SDH, soit sous forme d'un répresseur de la transcription, soit au niveau de la traduction d'un messager polycistronique (voir par exemple Goldberger et al. 1974, Polacco et al. 1973, Meyers et al. 1975, Foor et al. 1975). On peut aussi imaginer que la SDH et la LAT forment un complexe dont l'activité bascule soit vers la synthèse soit vers la dégradation: toutes les mutations qui modifieront la structure de ce complexe - soit en altérant la structure primaire de la LAT (comme le fait peut-être (lyc1.5)), soit en empêchant la formation d'un composé nécessaire à l'expression de cette activité comme (lyc3.1)- altèreront le fonctionnement de la SDH. On n'a pas observé d'inhibition de la SDH d'un extrait de W29 cultivée sur N5000 par l'extrait de la même souche cultivée sur N5000+10 mM lys: ceci ne signifie pas bien sûr qu'*in vivo* l'enzyme de la souche "réprimée" n'est pas en fait inactivé par une protéine en un complexe labile à l'extraction (voir pour un cas de ce genre les complexes ornithine transcarbamylase-arginase chez *S. cerevisiae*, Wiame 1971). On verra d'ailleurs au § d) ci-dessous que de tels effets peuvent être invoqués .
Deux autres points restent par ailleurs à éclaircir: quelle est l'origine de la baisse apparente de l'activité SDH dans les souches (lyc1.), et pourquoi n'observe-t-on pas une disparition totale de l'activité SDH? Il faut noter que dans une souche W29 cultivée sur lysine seule source de carbone, le "pool" de lysine passe de 20 µmoles/g de poids sec à 350 sans que l'activité SDH (174 nmoles de $NADH_2$/mn/mg de protéines) soit plus faible que sur N5000 + 10 mM lys (150 nmoles/mn/mg). Cette abscence de "répression"totale peut n'être qu'apparente (déstabilisation d'un complexe à l'extraction), ou traduire qu'un niveau résiduel d'activité reste nécessaire pour assurer la synthèse d'un précurseur (par exemple l'αAASA) dont la formation *de novo* serait empêchée par la rétrocontrôle de la lysine sur l'HS par exemple.

c) Recherches d'étapes limitants de la 2è partie de la voie par l'étude de l'effet des dosages géniques

Comme on l'a vu ci-dessus à propos de l'homocitrate synthétase (page 148), on peut espérer déduire l'existence d'étapes limitantes de l'effet des dosages géniques sur le niveau d'activité spécifique des enzymes concernés. Bien que les essais aient été limités à la comparaison de doses haploïdes et diploïdes, on avait conclu de l'effet des dosages (lys2.) et lys3.) que le taux de synthèse de l'AAR ne constituait pas une étape limitante de la production de lysine (voir page 117 et tableau 38). Les résultats pour l'AASAGR et la SDH ne sont pas du même type, voir tableau 50.

Tableau 50 - Etude de l'effet du dosage génique sur l'activité des enzymes tardifs

Souches (génotypes)	Activité spécifique[1]				Activité / allèle actif [2]			
	HS	AAR	AASAGR	SDH	HS	AAR	AASAGR	SDH
(+/+)	0.044	11	19.5	362	0.022	5.5	9.75	181
(lys1.10/+)	0.043	10.5	22.0	400	0.043	5.2	11.0	200
(lys3.12A/+)	0.060	4.9	21.0	370	0.030	4.9	10.5	185
(lys4.14B/+)	0.046	10.5	16.0	446	0.023	5.3	16.0	223
(lys5.12B/+)	0.050	10.0	36.0	306	0.025	5.0	18.0	306

[1] L'HS est dosée dans les conditions de dosage standard, les autres activités à 340 nm. Moyenne de deux essais.
[2] Calculée en divisant l'activité spécifique totale par le nombre d'allèles sauvages correspondant à l'activité dosée.

On constate que :

- la réduction du Nombre de copies d'un des gènes de l'AASAGR ou de la SD entraîne une dérépression de l'allèle sauvage correspondant.
- cette dérépression de l'allèle dont le dosage génique est modifié s'accompagne d'une dérépression gratuite de l'autre activité.
- l'AAR n'est jamais déréprimée, la réduction de son dosage génique entraîne cependant la dérépression spécifique des gènes de l'HS.
- La réduction du dosage génique de l'HS entraîne une faible riation de l'activité de l'AASAGR et de la SDH;réciproquem la réduction du dosage génique et de ces activités entraî

../.

faible variation de l'activité HS. La significativité de ces variations est douteuse et devrait être confirmée par l'étude de séries tri et tétraploïdes.

En attendant, les résultats obtenus pour la SDH et l'AASAGR conduisent à penser que:

-les activités AASAGR et SDH sont des étapes limitantes dans la production de la lysine, mais pas l'AAR. La réduction du nombre des copies de l'un quelconque des gènes correspondant à ces activités entraîne une limitation de la lysine produite.

-il y a alors "dérépression" simultanée des 2 activités jusqu'à ce que l'allèle sauvage ait compensé à 20% près la perte d'activité: on obtient alors un pool de lysine et un temps de génération voisins de ceux du sauvage, ce qui est observé.

On peut supposer que l'observation de ces phénomènes suggère l'existence de 2 types de régulation différents pour la SDH au moins. Il y a "dérépression" quand la concentration intracellulaire de lysine est limitante, et cette dérépression est apparente même quand le pool a rejoint sa valeur d'équilibre, parce que aucun catabolisme n'est induit à cette valeur du pool (voir ci-dessous). L'étude des combinaisons tri et tétraploïdes permettrait peut-être de distinguer pour l'HS aussi l'existence d'un signal "de détresse" qui courtcircuite les mécanismes classiques et spécifiques (voir Wolfner et al.(1975) pour l'interprétation et Hilger et al. (1973) pour une situation peut-être analogue chez *S. cerevisiae*).

d)Etude des variations d'activité spécifique au cours de la croissance.

On a vu ci-dessus que l'activité SDH de lyc5 (lyc1.5) était apparemment réduite par rapport à celle de la souche sauvage cultivée sur le même milieu. On a essayé de déterminer si cette activité était constante au cours de la croissance.

Pour toutes les expériences qui vont suivre, on a modifié par rapport au § a) les conditions de culture de la façon suivante, pour obtenir en début et en fin de culture des variations comparables du "pool"de lysine:

-préculture d'une nuit des souches à tester sur N5000 à 28°C

(500 ml dans un erlen de 1 l).

-transfert sans lavage des cellules dans 1500 ml de milieu N_o. On laisse les cellules dans ce milieu en les agitant à 28°C; elles y effectuent 1 à 2 divisions et on obtient une population homogène de petites cellules.

-ensemencement d'une série de fioles contenant 1 l de milieu N5000 (1 à 2.10^6 cellules par ml).

-arrêt des cultures au cours du temps de 2 h. en 2 h. après 4 h. (fin du lag), par centrifugation ou filtration à 0°C. Pour le point zéro, on utilise la préculture sur N_o.

-détermination sur les mêmes cultures des activités AAR, AASAGR et SDH, et des "pools" de lysine.

On a représenté sur les figures 33 à 35 un résumé de ces expériences. Toutes les souches ont un temps de génération voisin de 2 h. sauf celles qui portent (lyc1.5): 2h20min. Cette légère différence dans le temps de génération semble spécifique de (lyc1.): on la retrouve dans toutes les souches dérivées de lyc5 et dans un mutant (lyc1.) isolé indépendamment, lyc33. Elle n'est pas compensée par la lysine, mais on n'a pas essayé d'autres acides aminés. Toutes les souches ont effectué 6-7 générations sur N5000.

On constate que toutes les activités SDH mesurées augmentent en début de croissance et diminuent lorsque les cellules entrent en phase stationnaire. La diminution de l'activité en fin de croissance est sans doute due à la protéolyse, mais on n'a pas pu vérifier ce point de façon satisfaisante: si on ajoute un inhibiteur des protéases - le FPMS 1 mM - à des cellules en fin de phase exponentielle, on prévient effectivement la chute d'activité, mais si on l'ajoute à des cellules en croissance (voir fig. 35), on arrête immédiatement la croissance des cellules et la synthèse de la SDH: l'effet du FPMS sur *S. lipolytica* mériterait sans doute d'être étudié plus en détail. Nous reviendrons plus loin sur l'augmentation d'activité observée au sortir de la phase de carence.

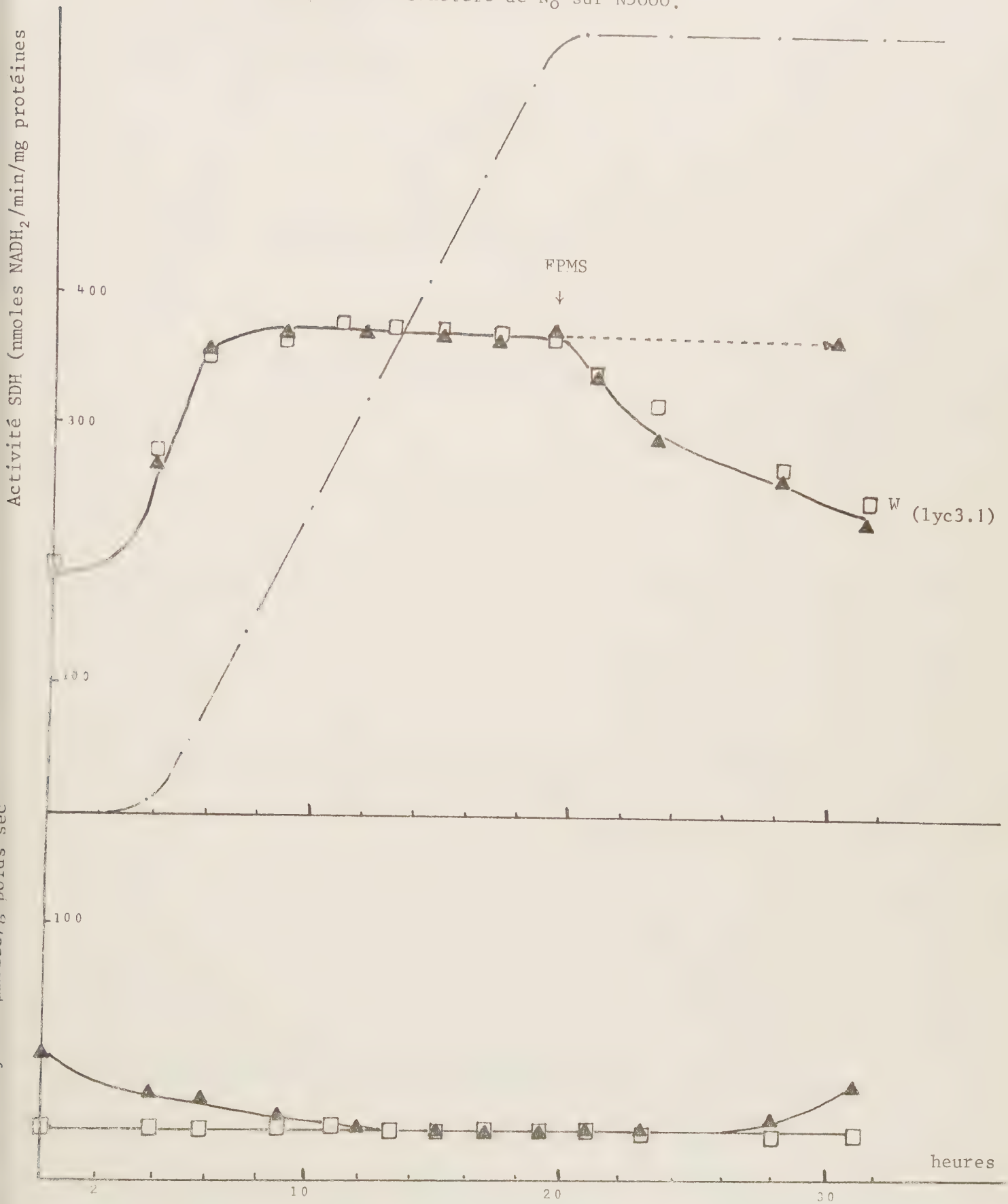
Au cours de la croissance exponentielle, les activités SDH et

les pools de lysine des souches W29 et lyc1(lyc3.1) sont identiques et constants; il en va de même pour les activités AASAGR et AAR -voir fig. 37. Ceci suggère que, contrairement aux souches porteuses de (LYC1.5) -voir ci-dessous- la quantité de lysine libre dans une souche sauvage est uniquement régulée au niveau de la voie de biosynthèse et qu'il n'y a pas de dégradation sur N5000. Par ailleurs, on peut admettre que le niveau du "pool" atteint dans une souche (lys1.5$^+$) sur ce milieu est tel qu'il n'y a pas répression de la SDH, puisque l'activité SDH de lyc1, qui n'est pas sensible à la répression, est égale à celle de W29 (fig 33)

Les souches mg5 (LYS1.5) et 139-1 (LYS1.5,lyc3.1) ont également un "pool" de lysine constant pendant la phase exponentielle, supérieur à celui de W29 ou lyc1, mais dont la taille dépend de la présence d'une mutation du catabolisme: 104 nmoles /mg de poids sec pour mg5, 212 pour 139-1 (voir fig. 34). Il y a peut-être dégradation de l'excès de lysine formée dans mg5, puisqu'on trouve de faibles quantités de N-ε-acétyllysine et de δ amino valérate dans son pool. L'effet est encore plus net sur paraffines où le "pool" de lysine de mg5 ne dépasse pas de 3 fois la taille de celui de W29 cultivé dans les mêmes conditions: l'introduction d'une mutation de type (lyc3.1) restaure un "pool" supérieur à celui de mg5 sur glucose.
On observe que l'activité spécifique de la SDH de mg5 est constante pendant la croissance, mais inférieure à ce qu'elle est pour W29: il y a répression par la lysine accumulée de novo. Cette répression est inférieure à celle qu'on attendrait d'une élévation comparable du "pool" de W29 (fig.31): on retrouve 78% de l'activité de W29, contre 65% atttendus. Dans 139-1 l'écart est encore plus grand: on attendait environ 50% de l'activité de W29 s'il y avait répression, et on trouve 10% d'activité en plus: il n'y a pas répression de la SDH d'une souche (lyc3.) par la lysine accumulée de novo.

La présence d'une mutation (lyc1.5) dans les souches modifie complètement l'allure des courbes obtenues: cette mutation semble affecter à la fois l'activité et la régulation de la SDH, voir fig.35. On constate que dans une souche (lys1.5$^+$, lyc1.5) le "pool" de lysine n'est pas supérieur à celui de mg5, et que pour

Fig.33 - Variations de l'activité SDH (en haut) et des"pool" de lysine (en bas) des souches W29 (□) et lyc1 (lyc3.1) (▲) après un transfert de N_o sur N5000.



On a représenté schématiquement la croube de croissance de ces souches (—— . ——

Au temps 20 h. , on a ajouté à la culture lyc1 1 mM FPMS et on a arrêté la culture à 30 h : (——→)

fig. 34 - Variations de l'activité SDH (en haut) et des "pools" de lysine (en bas) des souches mg 5(LYS1.5) (□) et (LYS1.5,lyc3.1) (▲) après un transfert de N_o sur N5000

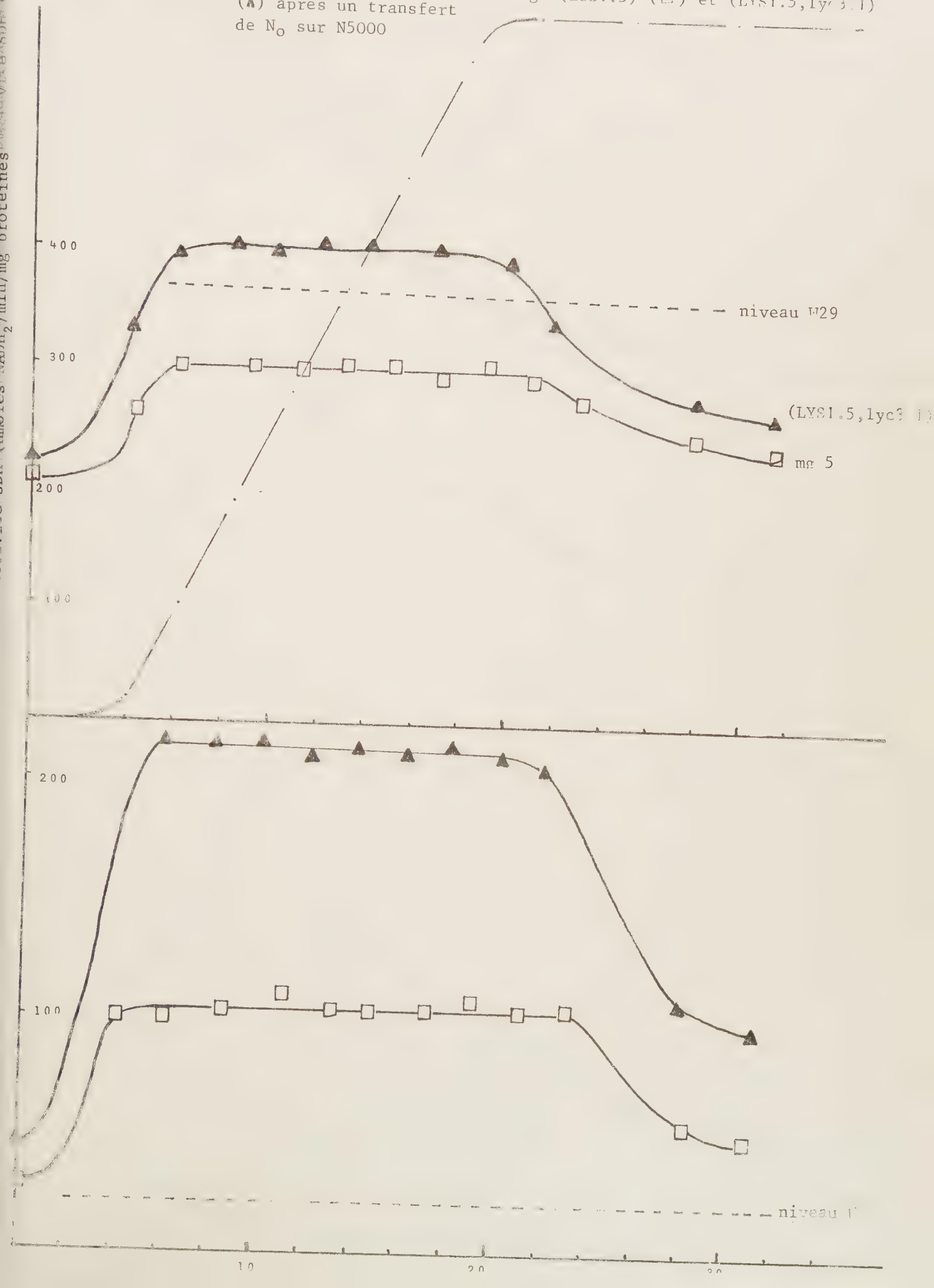


Fig. 35

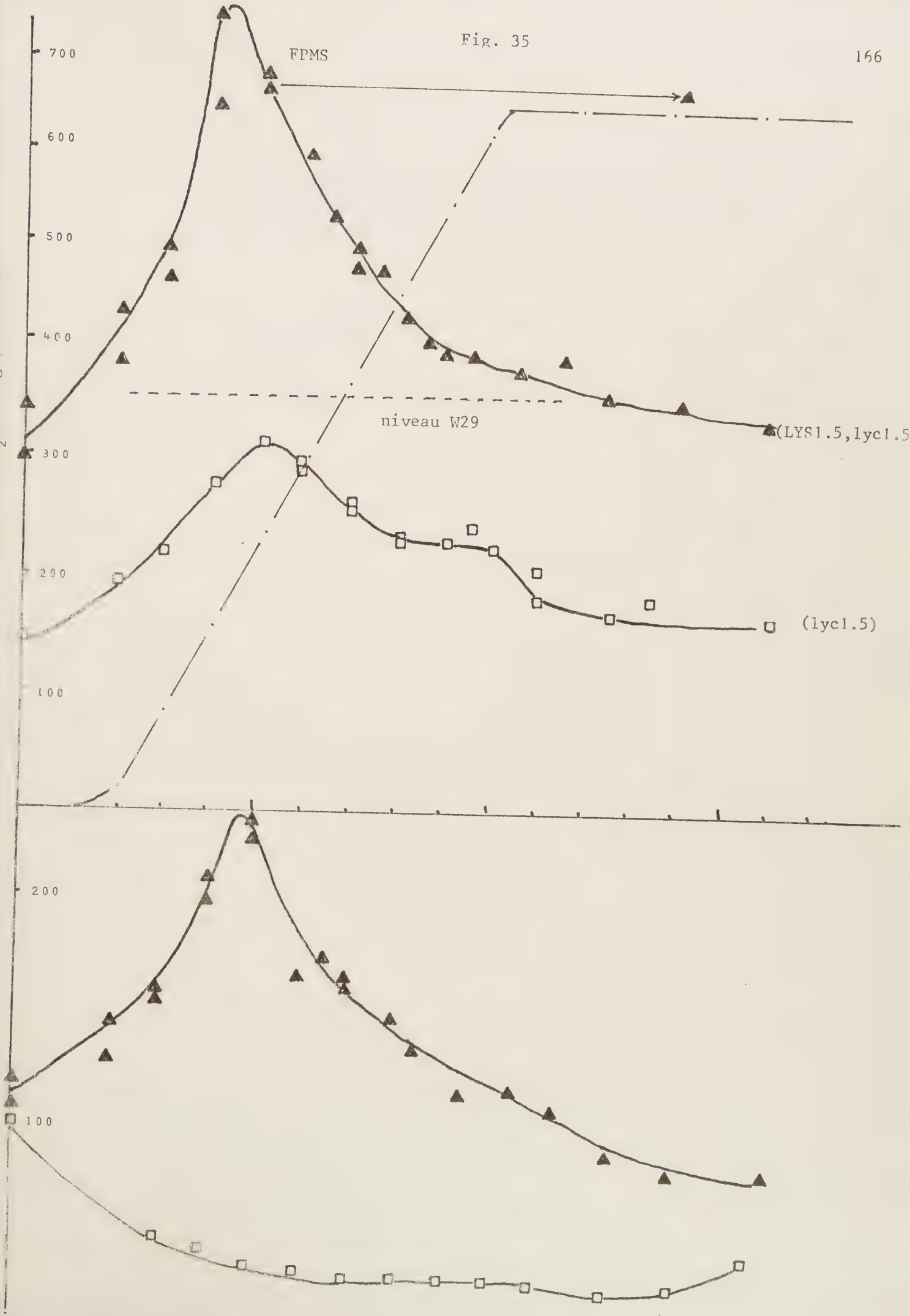

FPMS
700
600
500
400
300
200
100
niveau W29
(LYS1.5,lyc1.5
(lyc1.5)
200
100

Fig. 35 - Variations de l'activité SDH (en haut) et des "pools" de lysine (en bas) des souches lyc5. (lyc1.5) (□) et (LYS1.5, lyc1.5) (▲)

On a représenté schématiquement la courbe de croissance de ces souches (—— . ——)

Au temps 10 h. on a ajouté à une culture (LYS1.5,lyc1.5) 1 mM FPMS, on a arrêté la culture à 28 h. (----➔)

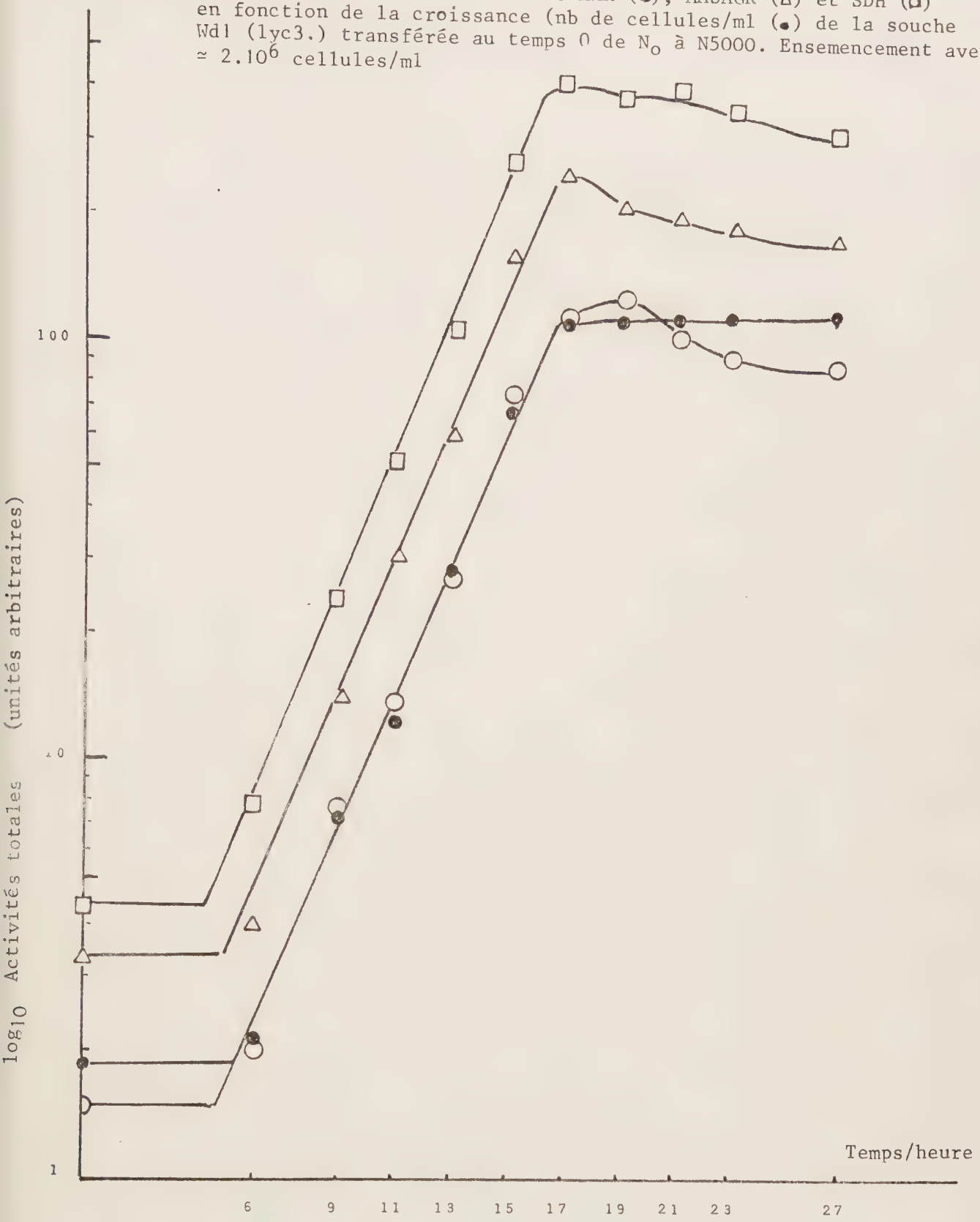
tant son activité SDH est inférieure. Le même résultat est obtenu avec le mutant isolé indépendamment lyc33(lyc1.33). L'activité SDH est de plus variable au cours de la croissance, de sorte qu'on ne peut définir dans ces conditions de phase exponentielle balancée. On constate cependant que l'activité spécifique tend à s'équilibrer en fin de croissance à une valeur proche de celle qui est obtenue en partant d'une préculture sur le même milieu (§ a)).

Dans une souche (LYS1.5,lyc1.5), le "pool" de lysine s'élève très au-dessus de celui de la souche sauvage, sans que l'activité SDH devienne jamais inférieure: on observe au contraire une augmentation importante de cette activité pendant les 2 premières générations au sortir de la phase de carence, suivie d'une chute pendant les générations suivantes; bien que ce comportement soit semblable à celui de ($lys1.5^+$, lyc1.5), on n'atteint cependant pas des conditions d'équilibre dans ces conditions. On a vérifié que les constantes d'affinité du système enzymatique mesuré (pour l'αKG, la lysine et le $NADPH_2$) étaient, pour chaque point d'une expérience, constantes et égales à celle de W29: il n'y a sans doute pas dérépression d'une activité parasite, mais variation de la SDH.

On pouvait se demander si la baisse de l'activité SDH enregistrée après la 2e génération d'une souche (lyc1.5) était due à une répression ou à un inactivation de la SDH. Dans ce cas, on s'attend à trouver une variation du taux de synthèse de la SDH dans la culture: ce taux peut s'annuler comme dans la fig.32, ou devenir négatif s'il y a inactivation. On a donc tacé sur la fig.36 les variations d'activité totale au cours de la croissance

En représentation semi-logarithmique, on obtient une droite pour l'accroissement de l'activité totale SDH des souches W29 ou lyc1(lyc3.1), voir fig.36-a. Les premiers points sont sur cette droite, on peut donc rendre compte des courbes d'activité spécifiques des fig. 33 et 34 en admettant qu'au sortir de la phase de carence, les synthèses de SDH démarrent au taux maximum Il n'y a pas d'indication de dérépression transitoire ou d'activation de molécules d'enzyme préexistantes.

fig. 36a - Evolution des activités totales AAR (○), AASAGR (Δ) et SDH (□) en fonction de la croissance (nb de cellules/ml (●) de la souche Wd1 (1yc3.) transférée au temps 0 de N_o à N5000. Ensemencement avec ≃ 2.10^6 cellules/ml



Les activités totales sont exprimées en (nmoles de coenzyme consommé/min/mg prot) × nb de cellules ($.10^{-6}$) présentes dans la culture.
On a vérifié qu'il y avait pour chacun des points parallèlisme entre l'accroissement cellulaire et la quantité totale de protéines présentes dans la culture

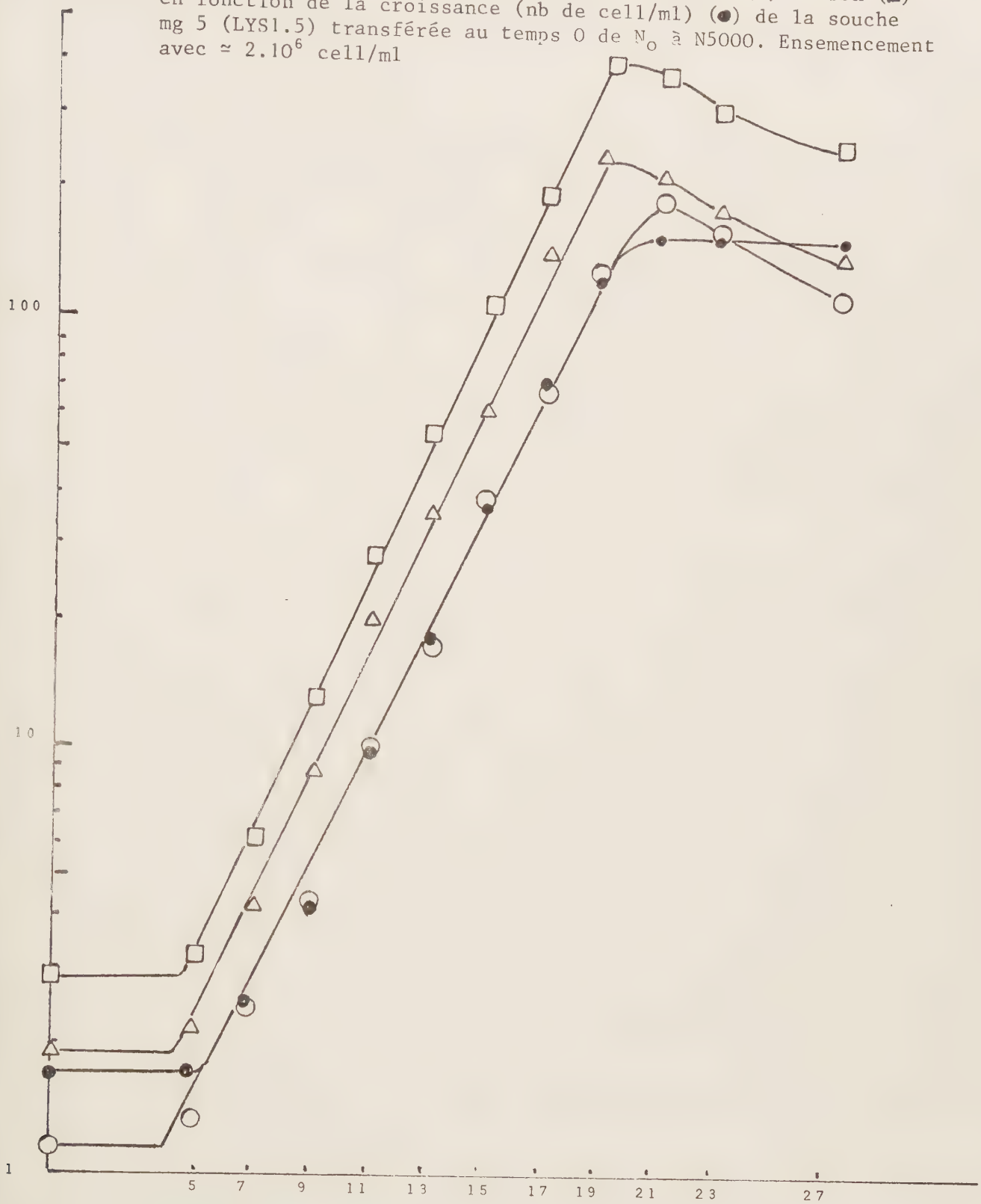
Au temps zéro les activités totales AAR, AASAGR et SDH sont respectivement de 16, 34 et 430 (unités ci-dessus).

De façon inattendue, on observe exactement le même parallèlisme entre le taux d'accroissement cellulaire et le taux de synthèse de la SDH pour les souches (lys1.5^{+}, lyc1.5) et (LYS1.5,lyc1.5) de 10 h. à 20 h., soit pendant 4 générations environ des cellul le taux de synthèse de la SDH apparaît constant, bien que l'activité spécifique diminue pendant cette période, voir fig. 36. Par ailleurs on constate que les premiers points sont significativement décalés par rapport à cette droite. Bien qu'on ne puisse pas exclure la possibilité d'erreurs expérimentales (les premiers points sont obtenus en filtrant jusqu'à 6 l de culture, soit un décalage de 30 à 45 min entre l'"arrêt" des cultures et le broyage), il nous semble plus satisfaisant d'attribuer ce décalage à une activation de molécules préexistantes ou à une dérépression transitoire du taux de synthèse au sortir de la carence (ce phénomène est d'ailleurs banal chez *S. cerevisiae*, voir Wolfner et al. 1975) parce que:

- on est obligé de supposer dans le cas contraire que les synthèses de la SDH ont démarré au taux maximum quelques instants après le transfert de N_o sur N5000, donc pendant les 4 h. de lag (voir courbes en pointillé).
- cette hypothèse rend compte de l'accroissement d'activité spécifique mesuré pendant les 10 premières heures (alors qu'un niveau stable supérieur à celui de (lyc1.5) est atteint par W29 plus rapidement) et de la décroissance observée ultérieurement, si l'on admet qu'il y a arrêt de l'induction et dilution de l'activité présente après la 8e heure, ce qui se traduit par un accroissement constant de la quantité d'enzyme présente dans la culture.
- il semble enfin peu probable qu'il y ait eu activation de molécules préformées, sauf si l'on admet que cette activation puisse se poursuivre pendant deux générations.

Si on admet ce qui précède, on peut extrapoler la courbe d'activité totale pour une croissance illimitée et calculer une activité spécifique théorique à l'équilibre, c'est à dire quand l'excès d'enzyme produit pendant les deux premières générations sera virtuellement dilué entièrement. On trouve des valeurs

fig.36b - Evolution des activités totales AAR (○), AASAGR (△) et SDH (□) en fonction de la croissance (nb de cell/ml) (●) de la souche mg 5 (LYS1.5) transférée au temps 0 de N_o à N5000. Ensemencement avec ≃ 2.10^6 cell/ml



Les activités totales sont exprimées en (nmoles de coenzyme consommé/min/mg prot) × nb de cellules ($.10^{-6}$) présentes dans la culture.
On a vérifié qu'il y avait pour chacun des points parallèlisme entre l'accroissement cellulaire et la quantité totale de protéines présentes dans la culture.

Au temps zéro les activités totales AAR, AASAGR et SDH sont respectivement de 12, 19, 280.

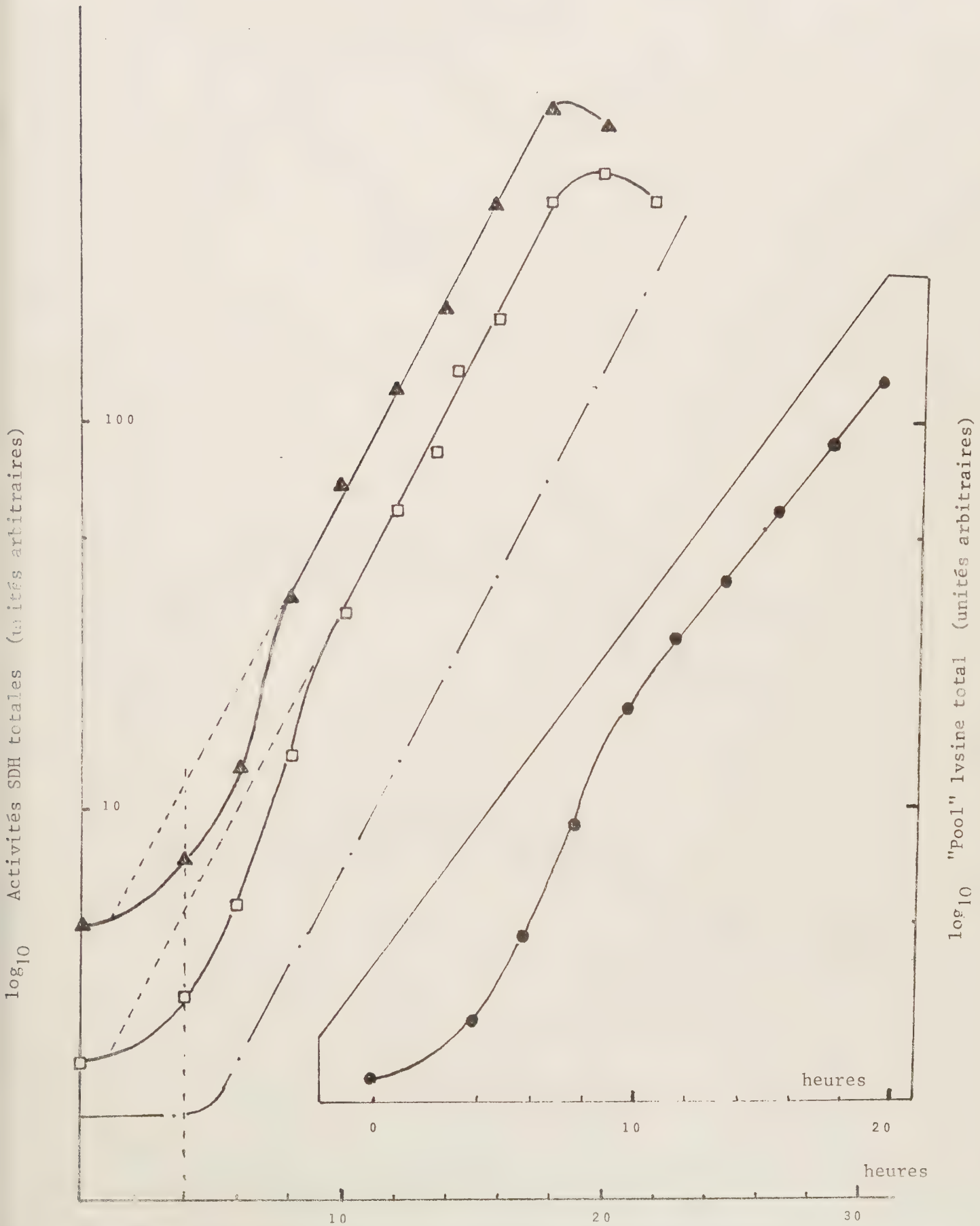
On obtient des courbes comparables avec (LYS1.5, lyc3.)

de 230 et 330 nmoles $NADH_2$/min/mg de protéines pour (lys1.5$^+$, lyc1.5) et pour (LYS1.5, lyc1.5). Il serait très intéressant de comparer ces valeurs à celles qu'on obtiendrait en chémostat; on sait cependant que les valeurs obtenues pour ces souches, quand on les précultive sur N5000 tamponné et qu'on les transfert sur ce même milieu pour les récolter après 10 à 11 générations, sont peu différentes des valeurs théoriques (220 et 310 nmoles $NADH_2$/min/mg de protéines): l'"effet (LYS1.5)" qui était peu prononcé en l'absence de (lyc1.5) semble ici conduire à une restauration presque totale de l'activité SDH diminuée des souches (lyc1.5).

Un autre phénomène étonnant et encore inexpliqué est observé sur la fig.35: alors que l'activité SDH de la souche (LYS1.5, lyc1.5) reste constamment supérieure à celle de (LYS1.5,lyc3.1), voir fig.34, le pool de lysine varie dans le même sens et en même temps que l'activité SDH. Si on admet que la lysine accumulée n'est ni dégradée (on ne trouve pas de N-ε-acétyllysine dans les pools), ni excrètée (on n'en trouve pas dans les surnageants de culture), ni incorporée plus rapidement dans les protéines, on peut supposer que les variations du pool observées traduisent une inhibition <u>in vivo</u> d'une des étapes de la biosynthèse après la 10^{e}h. Il est tentant de supposer que c'est la SDH qui est inhibée, peut-être par le produit anormal du gène (lyc1.5): chez certains mutants arginase$^-$ de *S. cerevisiae*, l'inhibition de l'ornithine transcarbamylase par l'arginase altérée est conservée (Wiame 1971). Il conviendrait donc de s'assurer par des expériences <u>in vivo</u> de l'activité de la SDH dans des cellules entières.

On a signalé enfin à propos des souches W29 et 139-1 que les activités AAR et AASAGR ne variaient pas au cours de la croissance. On constate cependant sur la figure 37 que cette affirmation n'est vraie que pour les souches (lyc1.5$^+$): on observe au contraire, et de façon concomitante à l'"induction" de la SDH, une "induction" de l'AASAGR, mais pas de l'AAR. Le parallèlisme des courbes d'activité spécifique de l'AASAGR et de la SDH est frappant et suggère qu'un mécanisme commun est à leur origine

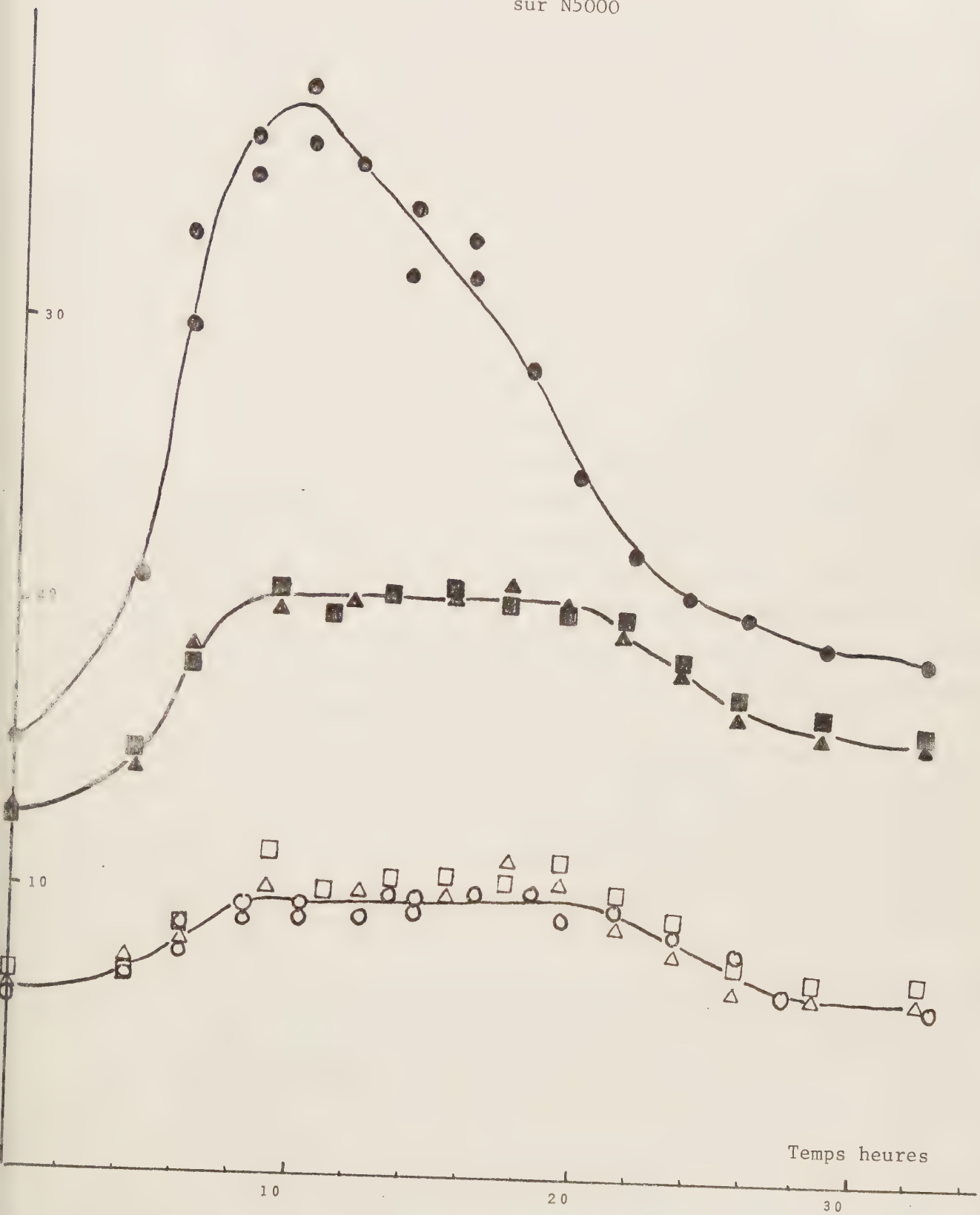
Fig. 36c - Evolution des activités totales SDH au cours de la croissance (—— · ——) des souches (lyc1.5) (□) et (LYS1.5,lyc1.5) (▲)



Mêmes conventions que pour les figures précédentes.

On a représenté en encart l'évolution de la lysine totale intracellulaire ("pool"

Fig. 37 - Variation des activités spécifiques de l'AAR (symboles clairs) et de l'AASAGR (symboles noirs) après un transfert sur sur N5000



Mêmes conditions de culture que sur les fig. 33à 35 correspondantes.

Souches utilisées : W29 (Δ), (lyc3.1) (□) et (LYS1.5,lyc1.5) (○)

Les souches (LYS1.5, lyc3.1) et (lyc1.5) donnent des courbes respectivement semblables à (lyc3.1) et (LYS1.5, lyc1.5).

On ne peut pas proposer d'explication définitive à ce phénomène mais il est tentant de le relier au fait que les souches (lyc1.5) accumulent en phase stationnaire un pool élevé de lysi au contraire des autres souches. Or on a décrit chez *S. cerevisiae* une action de la lysine sur deux autres voies de biosynthèse au moins: celle de la méthionine-thréonine-isoleucine au niveau de l'aspartokinase (de Robichon-Szulmajster et al. 1967) et celle de l'arginine au niveau de l'ornithine transcarbamylase (Ramos et al. 1970). On peut imaginer que le pool de lysine élevé présent en début de croissance dans les souches (lyc1.5) inhibe l'une de ces voies rendant phénotypiquement ces souches bradytrophes pour d'autres acides aminés. On observerait alors en réponse une dérépression des activités soumises au contrôle biosynthétique général, voir Wolfner et al. (1975). Cette interprétation suggère que l"effet mg5" pourrait avoir la même origine. On rappellera à ce propos deux observations qui viennent peut-être appuyer cette interprétation:

- il y a dérépression simultanée de la SDH et de l'AASAGR dans certains diploïdes hétérozygotes pour un allèle muté de ces activités, voir tableau 50.
- On observe sur N100 un ralentissement de la croissance de W29 et une diminution de l'activité SDH; ces deux phénomènes sont simultanément corrigés par la lysine, qui sert alors partiellement de source d'azote (voir 4e partie) et jusqu'à un certain point apparaît comme un"inducteur" de la SDH (voir tableau 51).

Tableau 51 Effet de la lysine sur la SDH de W29 en N100 et N5000.

Concentration initiale en lysine (g/l)	Activité spécifique SDH (nmoles $NADH_2$/min/mg prot) N100	N5000
0	124	365
0,1	132	265
1	316	162
5	262	155
10	176	150

Préculture et culture de 8h. sur les milieux indiqués.

Conclusion Bien que les résultats présentés soulèvent plus de questions qu'ils n'apportent de réponses, on peut admettre que:

-la synthèse de la SDH d'une souche sauvage est réprimée en présence de lysine, sans qu'on puisse préciser le niveau et le mécanisme de cette répression. La répression observée ne conduit pas à une disparition total de l'activité SDH de la culture: en présence de concentrations saturantes de lysine, on observe une synthèse résiduelle d'activité, légèrement inférieure à la moitié du témoin sans lysine.

-la répressibilité de la SDH est affectée par certaines mutations de la voie catabolique: certaines l'annulent (lyc3.1), d'autres la modifient d'une façon encore imparfaitement déterminée (lyc1.5).

Il est enfin possible que la SDH et l'AASAGR (et peut-être d'autres étapes limitantes de la voie comme l'HS) soient soumises à un système de contrôle général des voies de biosynthèse, dont les effets ne sont observés qu'en présence de mutations (lyc1.5) ou (LYS1.5) qui modifient la taille du pool en phase stationnaire et/ou en phase exponentielle.

Il peut paraître surprenant que le dernier enzyme de la voie de biosynthèse, et non le premier ou les précédents (AAR ou AASAGR) , soit réprimé en présence de lysine. Bien qu'aucune interprétation définitive de ce phénomène ne puisse être avancée, on peut proposer les hypothèses suivantes:

-seules les deux dernières étapes de la voie sont uniquement impliquées dans la biosynthèse de la lysine, le taux de synthèse de l'HS semble régulé par un intermédiaire ou un dérivé de la voie. Une hypothèse comparable a été proposée chez *S. cerevisiae* par Tucci et Ceci (1972b).

-la répression de la SDH peut entraîner l'accumulation de saccharopine ou d'αAASA, qui joueraient un rôle dans la répression des étapes antérieures.

Au terme de ce chapître, il est clair qu'on ne dispose pas d'une image cohérente de la régulation de la biosynthèse de la lysine. En dehors de certains points qui demandent confirmation et qui ont été cités, il semble important de procéder à une meilleure définition enzymatique de cette voie de biosynthèse. L'obtention de mutants affectés dans les contrôles observés permettra sans doute par ailleurs de révèler des mécanismes de régulation encor inconnus.

III. APPROCHE GENETIQUE DES ELEMENTS DE REGULATION

Un problème très général dans l'obtention de mutants de régulation est celui du crible : celui-ci dépendra des propriétés qu'on attend de tels mutants . On peut envisager deux approches :

- la première et la plus directe consiste à sélectionner des mutants affectés dans un des enzymes qu'on suppose soumis à régulation. Cette méthode permet en particulier d'obtenir des mutants de "feedback" (par réversion de souches auxotrophes), on peut imaginer son application dans le cas d'enzymes soumis à une régulation autogène ou dans le cas de complexes "basculants" (voir les hypothèses sur la SDH). Elle est très vite limitée si on cherche des mutations non liées aux gènes de structure connus ou impliquant des mécanismes inconnus. Nous l'avons appliquée à la recherche de mutants de "feedback" de l'homocitrate synthétase.

- la seconde méthode postule qu'une altération d'un mécanisme de régulation se traduira par une accumulation ou une excrétion du produit final. Une sélection directe de mutants accumulateurs est difficile puisqu'elle exige de tester individuellement un grand nombre de souches pour l'accumulation ou l'excrétion. Par ailleurs il n'est pas évident que n'importe quelle mutation de régulation conduise à une augmentation du "pool": il peut exister,en "amont" ou en "aval" du point modifié, un système limitant. Les mêmes critiques peuvent être faites à une sélection fondée sur la recherche de mutants excréteurs. Il est, de plus, loin d'être évident qu'une seule étape mutationnelle suffise pour dépasser les possibilités de stockage de la cellule et provoquer l'excrétion. Ce qu'on cherche, en fait, à modifier avec une mutation de régulation (autre que celles affectant le rétrocontrôle) c'est une étape limitante. Celle-ci peut l'être pour deux raisons au moins :

  . soit parce que l'enzyme correspondant est synthétisé dans la souche au taux minimum compatible avec le flux d'intermédiaire nécessaire à assurer la synthèse requise du produit final.

../..

Toute réduction de ce taux de synthèse entraînera une diminution comparable du produit final formé, mais un accroissement de ce taux n'entraînera une augmentation du produit final que dans la mesure où il existe, avant ou après l'étape modifiée, une autre étape qui deviendra limitante à son tour.

. soit parce que les concentrations cellulaires des substrats de cet enzyme ne peuvent subir des variations importantes : c'est le cas en particulier des enzymes utilisateurs de cofacteurs ou de produits d'"intérêt général" (NAD(P)-$NAD(P)H_2$, (Acétyl)CoA, ATP, glutamate, etc..). Toute augmentation de l'activité spécifique de cet enzyme sera limitée par les substrats disponibles.

Une méthode classique consiste à rechercher des mutants de résistance à un analogue toxique du produit final: on espère que parmi ceux-ci il s'en trouvera qui réverseront au moins au niveau de la synthèse protéique (charge et activation des tRNA) l'effet toxique de l'analogue par une surproduction du produit physiologique (ici la lysine). On est ramené à une recherche de mutants accumulateurs, mais sur un échantillon réduit. Si on dispose d'analogues ayant, en plus de leur effet sur la synthèse protéique,des cibles variées dans le métabolisme, on pourra sélectionner des modifications différentes suivant l'analogue testé. Cette méthode est donc en principe très puissante, elle est en fait limitée dans les cas où il existe un système de régulation "majeur" : son dérèglement provoquera dans tous les cas une surproduction du produit final et si on sélectionne les souches pour l'accumulation, on a toutes les chances de trier les mutations de ce système.

On pourra, suivant les cas, essayer par exemple de :

1. sélectionner, à partir des meilleures souches isolées pour ce premier système, des dérivés plus résistants (à un autre analogue, ou même à des doses plus fortes) parce que plus accumulateurs.

2. court-circuiter le premier système de régulation pour qu'une altération des autres systèmes puisse se manifester, et reprendre un autre programme de sélection.

3. Sélectionner à partir de ces mêmes souches des excréteurs en espérant que l'excrétion sera provoquée par l'altération d'un autre système de régulation ou des systèmes d'accumulation.

A. Recherche de mutants de "feedback" dans les réversions de (lys1.)

On n'a étudié que les réversions de lys1, lys4, lys6, lys7, lys8 et lys10. Les souches ont été irradiées aux UV et étalées sur N5000. On a prélevé des révertants de différentes tailles et morphologies pour avoir un échantillon de la population.

108 révertants par souche ont été testés pour l'excrétion (lys5 souche indicatrice) : aucun n'était excréteur.

On a ensuite cherché à savoir si certains étaient résistants à la 4-5-transdéshydrolysine qui est inhibitrice in vitro de l'homocitrate synthétase et toxique pour W29 à 10^{-4}M. On a trouvé des résistants dans les réversions de lys4, lys7, lys8 et lys10, mais pas dans celles de lys1 et lys6. Le seuil de résistance varie entre 5.10^{-4}M et 5.10^{-3}M.

On n'a conservé que 25 résistants par souche originelle (ceux qui étaient résistants à la TDL ou qui poussaient bien sur N5000: 3/4 poussent mal). On a mesuré pour chacun d'eux les temps de génération sur glucose et on a gardé ceux qui poussaient aussi vite que W29. On a déterminé sur ceux-ci le "pool" de lysine. Les souches les plus accumulatrices ont été testées pour l'activité spécifique de l'homocitrate synthétase et pour sa sensibilité à la lysine (les niveaux d'activité et les pourcentages d'inhibition sont à comparer à ceux donnés dans ce tableau pour W29 : conditions différentes des conditions standard) -(voir tableau 52.)

../..

Tableau 52 - Recherche de mutants de feedback dans les réversions de(lys1.)

A. Résultats généraux.

Origine des souches testées	Nbre de souches testées	Nb. de souches ayant un pool de lysine >50 µmoles /mg PS	Nb. de souches ayant un pool de lysine <30 µmoles /mg PS	Inhibition de l'HS par 1 mM lys	Résistance à la TDL ⋆
W29				70%	-
Réversions de lys1.1	16	0	16	70 - 80%	-
Réversions de lys4	15	7	8	30 - 60% 70 - 80%	+ à +/- -
Réversions de lys6	12	0	12	- 70 - 80%	-
Réversions de lys7	15	5	10	30 - 60% 70 - 80%	+/- -
Réversions de lys8	20	10	10	30 - 60% 70 - 80%	+ à +/- -
Réversions de lys10	20	3	17	50% 70 - 80%	+/- -

⋆ Résistance $>5.10^{-4}$M (+), 10^{-4} M (+/-), $<5.10^{-5}$ M (-)

../..

B. Etude des souches accumulatrices

Souches testées	Pool de lysine	Résistance à la TDL	Activité spécifique HS	Inhibition HS par I mM lys
W29	25	-	0,013	76
lys4 r 1	66	+/-	0,011	38
lys4 r 6	102	+	0,009	30
lys4 r 7	43	+/-	0,015	61
lys4 r 8	57	+/-	0,016	50
lys4 r 10	65	+/-	0,011	46
lys4 r 12	59	+/-	0,013	49
lys4 r 14	78	+	0,014	32
lys7 r 2	81	+/-	0,018	36
lys7 r 3	56	+/-	0,015	48
lys7 r 6	72	+/-	0,011	41
lys7 r 9	93	+/-	0,015	32
lys7 r 13	64	+/-	0,008	52
lys8 r 10	101	+	0,016	27
lys8 r 11	115	+	0,010	31
lys8 r 12	96	+	0,012	35
lys8 r 15	93	+	0,009	33
lys8 r 16	84	+	0,010	41
lys8 r 17	63	+/-	0,011	54
lys8 r 18	105	+	0,015	32
lys8 r 20	89	+/-	0,013	38
lys8 r 23	98	+	0,014	31
lys8 r 25	59	+/-	0,011	61
lys10 r 5	57	+/-	0,015	48
lys10 r 7	64	+/-	0,017	52
lys10 r 12	53	+/-	0,014	40

On constate que la résistance à la TDL peut, dans tous les cas être expliquée par une désensibilisation de l'homocitrate synthétase. Cette désensibilisation s'accompagne toujours d'une augmentation du "pool" de lysine: il est probable qu'on a affecté un des principaux systèmes de régulation.

B. Effets d'analogues toxiques de la lysine

a) Effets sur la souche sauvage

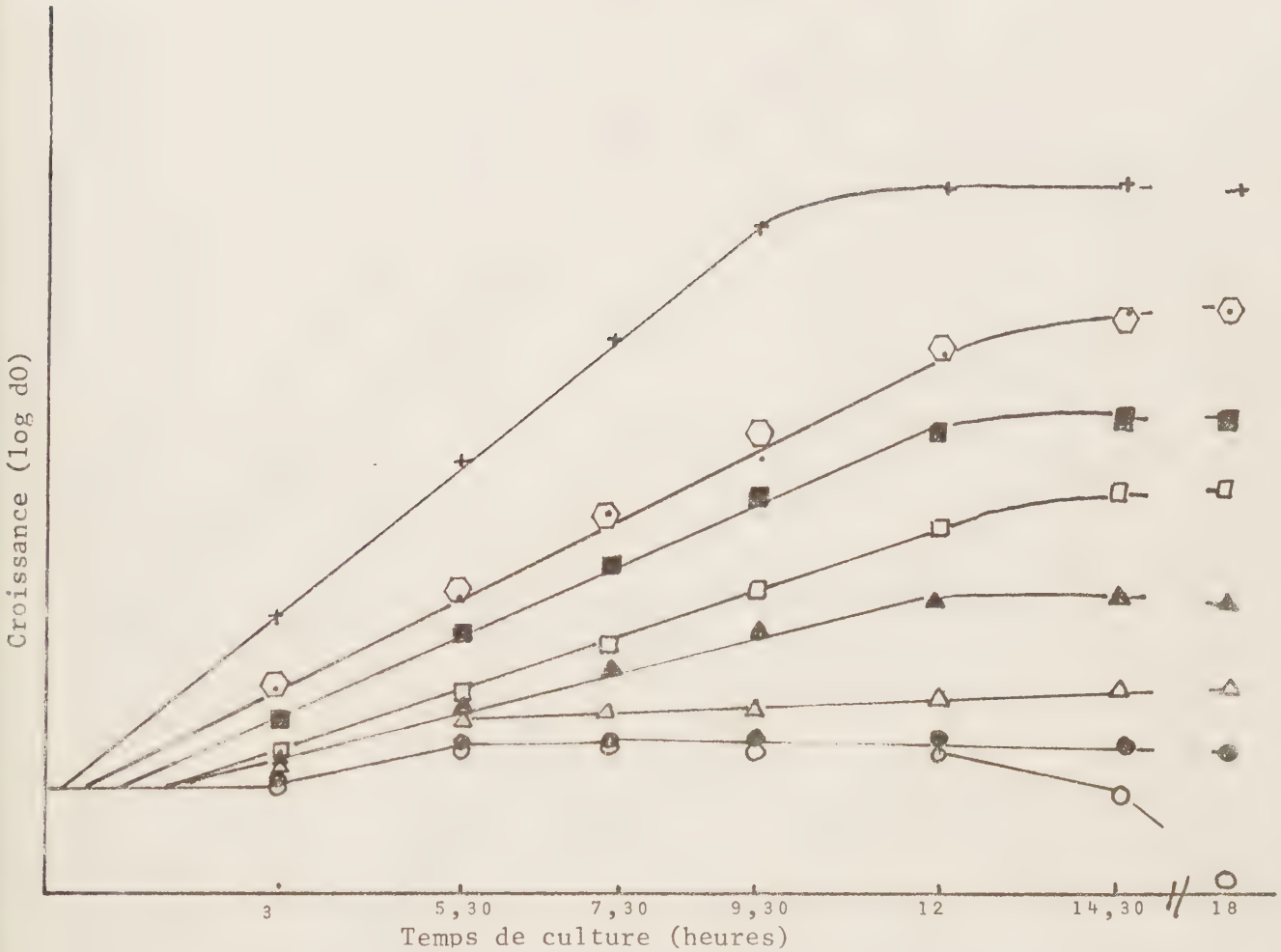
On a d'abord recherché un effet en milieu liquide. La souche W29 est cultivée une nuit sur N5000 puis transférée en phase exponentielle en fioles de Klett contenant le même milieu additionné des analogues suivant 5 mM : N α carboxybenzoxylysine, N-ε-méthyllysine, N-ε-éthyllysine, L-lysine hydroxamate, Dl-amino-3-cyclohexylalanine, thréo-DL-5-hydroxylysine, DL-4-5-transdéshydrolysine (TDL), et S-amino éthylcystéine (AEC). On voit sur la fig.38 que tous les composés testés sont inhibiteurs à des degrés diver de la croissance de la souche sauvage, l'inhibition est totale en présence d'AEC et de TDL. Toutes ces inhibitions sont réversées au moins partiellement par la lysine 5.10^{-4}M.

Sur milieu solide, on n'enregistre d'effet notable que pour la TDL et l'AEC 5.10^{-4}M (inhibition totale) et un retard de croissance en présence de DL-amino-3-cyclohexylalanine, 5-hydroxylysine et L-lysylhydroxamate 10^{-3}M. On a vu plus haut que seule la TDL (et non l'AEC) était inhibitrice de l'homocitrate synthétase in vitro : on peut donc espérer obtenir deux types de mutations de résistance au moins, en dehors des mutations de perméation et de détoxification.

b) Effets sur des mutants précoces.

On a essayé de déterminer si l'un des deux inhibiteurs les plus puissants agissait sur la deuxième partie de la voie de biosynthèse. Pour cela, on a testé leur effet sur des mutants cultivés sur aminoadipate : si la TDL par exemple n'agit qu'au niveau de l'homocitrate synthétase, une souche de type (lys1.) n'y sera pas sensible sur aminoadipate. L'expérience a porté sur les souches 8041.9 (lys1.13) et 5202.7 (lys1.4). Comme on le voit sur la fig.39, la trans-déshydrolysine n'affecte que faiblement la croissance de ces souches tandis que l'inhibition par l'AEC est encore très

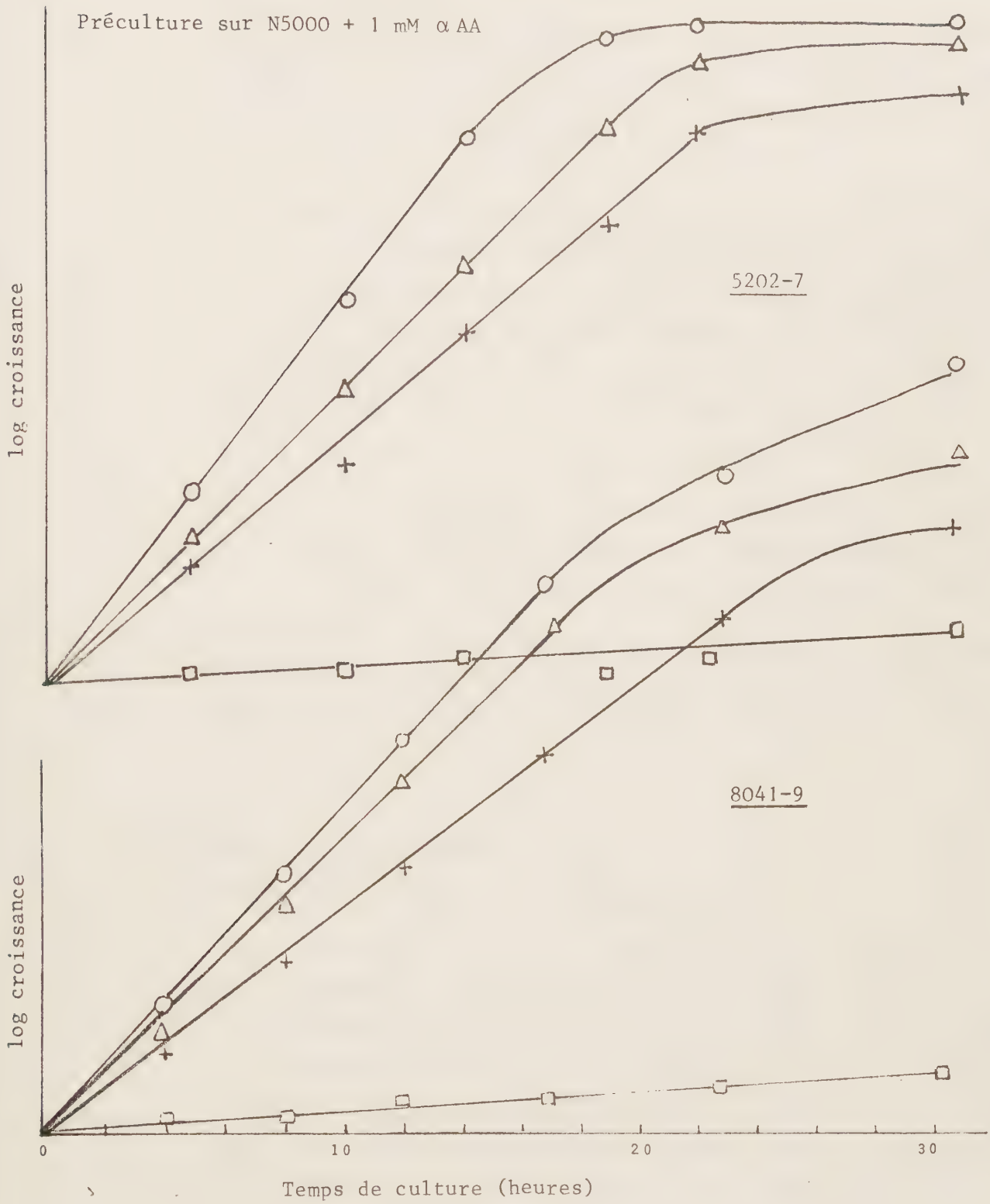
Fig. 38 - Effet d'analogues 5 mM sur la croissance de W29



+ Témoin
• N CBZ lysine
⬡ N méthyl lysine
□ Lysyl hydroxamate
■ Ethyl lysine
▲ Thréo 5 hydroxylysine
△ Cyclohexylalanine
● TDL
○ AEC

La souche sauvage W29 est précultivée sur N5000 pendant une nuit et transférée en phase exponentielle sur les milieux contenant les analogues. On suit la croissance par néphélométrie. Milieux tamponnés à pH 5,0.

Fig. 39 - Effet de la TDL et de l'AEC sur la croissance de mutants précoces cultivés sur αAA



- o Témoin
- △ TDL 5.10^{-4} M
- \+ TDL 10^{-3} M
- □ AEC 5.10^{-4} M

Les souches sont précultivées sur N5000+αAA et transférées en phase exponentielle sur le même milieu contenant différents analogues de la lysine. Milieux tamponnés à pH 4,0.

marquée. On peut supposer que l'AEC agit sur l'un des enzymes de fin de chaîne ou sur l'incorporation dans les protéines, tandis que la TDL agirait principalement sur un ou plusieurs enzymes du début de la voie.

En résumé, on dispose de deux analogues toxiques de la lysine qui semblent affecter en des points différents la voie de biosynthèse de la souche sauvage. On avait vu plus haut que le L-lysylhydroxamate mimait la lysine pour la répression de la SDH : l'utilisation de cet analogue est néanmoins difficile pour deux raisons :

- l'inhibition n'est jamais totale;
- il y a probablement hydrolyse partielle de l'hydroxamate par les cellules, puisque ce composé permet la croissance de souches lys$^-$ après un jour de phase de latence.

Ces difficultés pourraient être tournées en recherchant des souches sensibles à l'hydroxamate, on n'a étudié pour l'instant que des mutations conférant la résistance à la TDL et à l'AEC.

C. Etude de la résistance à la TDL

a) Isolement de mutants à partir de W29

On a étalé 10^8 cellules de W29 sur N5000 + TDL 5.10^{-4}. Un grand nombre de petites colonies apparaît progressivement. On a prélevé 34 colonies parmi celles qui étaient apparues les premières qu'on a sous-clonées sur YE et retestées sur TDL : 25 souches résistantes ont été retenues. Elles sont toutes résistantes à 10^{-3}M TDL (croissance en une nuit) et poussent après deux jours au plus sur TDL 10^{-2}M. Elles sont toutes résistantes à l'AEC 10^{-3}M et sensibles à 10^{-2}M. Elles n'excrètent pas de lysine. On les a appelées mg.1 à mg.32.

On a recherché un effet au niveau de l'homocitrate synthétas (inhibition par la lysine 10^{-3}M) et du "pool" de lysine (cultures arrêtées entre 5 et 8.10^7 cellules/ml).On a

également essayé d'éliminer les mutations de perméation en testant la croissance de ces souches sur lysine, source de carbone (voir tableau 53).

Tableau 53 - Etude des souche TDL^R dérivés de W29

Souches	Croissance sur lysine C	Pool de lysine (µmoles/g PS sur N5000	Inhibition de l'HS(1) par 1 mM lysine *
W29	+	20	70
mg 1	-	22	69
mg 2	-	19	75
mg 3	+	82	42
mg 5	+	106	20
mg 7	+/-	52	56
mg 8	+	87	38
mg 9	+	65	48
mg 10	+/-	18	75
mg 11	+	95	21
mg 15	-	25	
mg 16	+	68	37
mg 17	+	47	41
mg 18	+	53	48
mg 19	+	82	35
mg 20	+	66	47
mg 21	-	19	
mg 22	-	21	
mg 23	+	62	46
mg 24	+	53	43
mg 25	+/-	17	76
mg 26	+	52	42
mg 28	-	25	
mg 30	+	69	45
mg 32	-	21	76

* Conditions initiales d'extraction de l'HS (pas de FPMS dans le tampon de broyage : l'inhibition par la lysine ne dépassait pas 70%

../..

On constate qu'il existe une bonne corrélation entre:

- la non croissance sur lysine source de carbone, l'existence d'un pool normal et d'une homocitrate synthétase sensible . 10 mutants.
- la croissance sur lysine source de carbone, l'élévation du pool de lysine libre et la désensibilisation de l'homocitrate synthétase . 15 mutants.

On en conclut que deux types de mutations principales conduisent à la résistance à la transdéshydrolysine : modification de la perméation et modification de l'homocitrate synthétase. On a étudié plus en détail la souche mg.5.

b) Etude de la souche mg.5

A l'aide de la nystatine, on a sélectionné une mutation ade$^-$ spontanée dans la souche mg.5. On a croisé cette souche par 8051.11 (his1.) et par des souches porteuses de (lys1.). On constate :

- que les diploïdes résultant d'un croisement mg.5 x 8051.11 sont résistantes à la TDL 1 mM et sensibles à 10 mM. De très nombreuses colonies apparaissent rapidement dans ce dernier cas sur un fond de cellules incomplètement bloquées.
- que les diploïdes résultant d'un croisement de mg.5 par une souche porteuse d'une mutation (lys1.) sont phénotypiquement identiques aux précédents, sauf quand on utilise l'allèle (lys1.13) : dans ce dernier cas, le diploïde est sensible sur TDL 0,1 mM , mais pousse sur TDL 0,05 mM (alors que la souche W29 est encore inhibée).

On en conclut que la mutation portée par mg.5 affecte vraisemblablement le gène (lys1.) et on l'a appelée (LYS1.5). On n'observe pas de descendants lys$^+$TDL^S sur 85 spores lys$^+$ d'un diploïde (lys1.10/LYS1.5)

../..

En milieu liquide, la souche mg.5 est sensible à la plupart des analogues toxiques de la lysine, mais beaucoup moins que W29 (voir fig.40); on constate cependant qu'elle reste sensible à l'AEC.

c) Recherche d'autres mutants TDL^R

L'analyse des résistants induits dans W29 avait été compliquée par le fait que les souches obtenues étaient prototrophes. Elle pouvait par ailleurs avoir été biaisée par le mode de sélection choisi : on s'était placé à une concentration de TDL 50 fois supérieure au seuil de sensibilité de W29 (0,01 mM TDL). On a donc repris l'expérienc sur la souche 105.1 (B, ura2.); 28 mutants résistants à la TDL 5 . 10^{-5}M ont été obtenus et étudiés (voir tableau 54) :

- pour l'effet (lys1.13) (diploïde testé sur TDL 0,1 mM) et pour la dominance (diploïde testé sur TDL 0,5 mM).
- pour le seuil de résistance à la TDL : test sur boîtes N5000 + TDL 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 et 5 mM.
- pour le seuil de résistance à l'AEC : mêmes concentrations sur boîtes.

On constate que les souches étudiées se répartissent en 3 groupes phénotypiques :

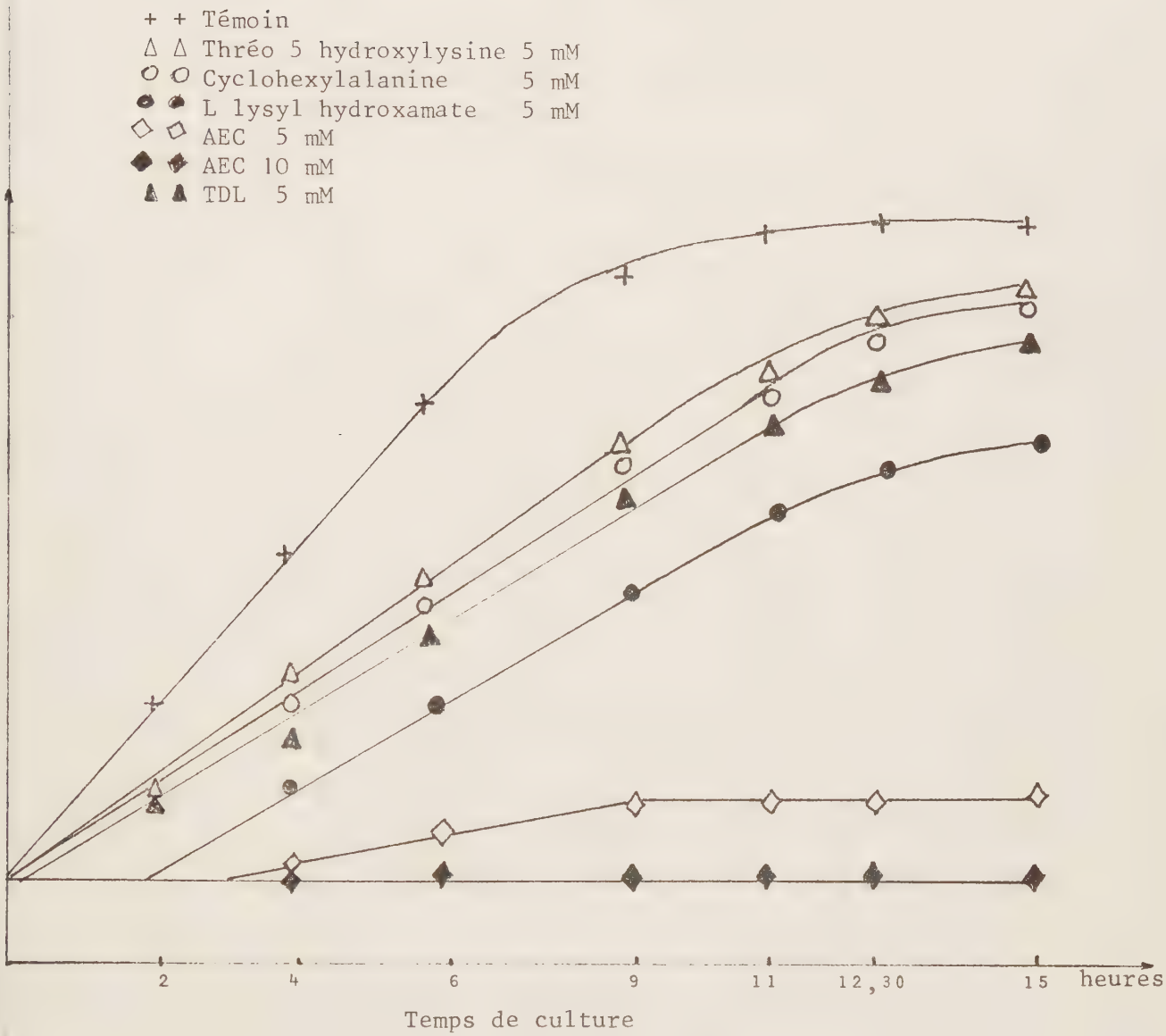
- celles qui sont récessives sur TDL 0,5 mM bien que leurs seuils de résistance à l'AEC et à la TDL soient supérieurs à 5 mM dans les souches de départ. Il peut s'agir de mutations affectant soit la régulation de la voie par un mécanisme différent de mg.5, soit le transport de la lysine (20 souches).
- celles qui sont dominantes à l'état hétérozygote quelle que soit la forme du gène (lys1.) : (+) ou (lys1.13). (3 souches).
- celles qui se comportent comme mg.5 et sont sensibles à l'effet (lys1.13). (5 souches).

Tableau 54 - Etude des souches TDL^R dérivées de 105.1 (ura2.)

Souches	Seuil de résistance à la TDL(mM)	Seuil de résistance à l'AEC(mM)	Dominance sur TDL 0,5 mM	Effet (lys1.13) sur TDL (0,1 mM (1)
mg 101	> 5	> 5	-	-
mg 102	> 5	> 5	-	-
mg 103	> 5	> 5	-	-
mg 104	> 5	> 5	-	-
mg 105	1	0,1	+	-
mg 106	> 5	> 5	-	-
mg 107	> 5	> 5	-	-
mg 108	> 5	1	+	+
mg 109	> 5	> 5	-	-
mg 110	> 5	> 5	-	-
mg 111	0,5	0,05	+/-	-
mg 112	> 5	> 5	-	-
mg 113	> 5	> 5	-	-
mg 114	> 5	> 5	-	-
mg 115	> 5	> 5	-	-
mg 116	1	0,5	+	-
mg 117	> 5	> 5	-	-
mg 118	> 5	1	+	+
mg 119	1	0,1	+	-
mg 120	1	> 0,5	+/-	-
mg 121	> 5	> 5	-	-
mg 122	> 5	> 5	-	-
mg 123	> 5	> 5	-	-
mg 124	> 5	> 5	-	-
mg 125	0,5	0,1	+/-	+/-
mg 126	> 5	> 5	-	-
mg 127	> 5	> 5	-	-
mg 128	> 5	> 5	-	-
W29	0,01	0,01		-
mg 5	5	> 5	+/-	-

(1) On a noté - les diploïdes mg x (lys1.13) qui ne poussaient pas sur TDL 0,1 mM, + les autres

Fig. 26 - Effets d'analogues sur la croissance de mg-5



La souche mg5 (LYS1.5) est précultivée une nuit sur N5000 tamponné à pH 5,0 et transférée en phase exponentielle sur le même milieu contenant les analogues testés. On suit la croissance par néphélométrie.

Cette dernière classe représente sans doute des mutations allèles de (LYS1.5). On a mis à sporuler sur V8 les diploïdes résultant de la confrontation avec 8041-9 (A, lys1.13) d'un représentant de la 1ère classe(mg-102), 2 représentants de la 2ème(mg 108 et mg 118)et d'un présum mutant de"feedback" (mg 116).Les ségrégations sont rappor- dans le tableau 55.

Tableau 55 - Liaison des gènes conférant la résistance à la TDL au gène (lys1.)

Diploïdes testés	Phénotypes observés dans la descendance			
	lys^+TDL^R	lys^+TDL^S	lys^-100 (1)	lys^-1000(2)
mg 102 x 8024.9	49	44	38	NT
mg 108 x 8024.9	127	0	108	NT
mg 118 x 8024.9	87	0	79	NT
mg 116 x 8024.9	56	0	51	NT
mg 103 x 8024.9	28(2)	32(2)	25(2)	16 (2)
mg 113 x 8024.9	37(2)	31(2)	28(2)	25 (2)

Tous les milieux sont supplémentés en uracile 100 mg/1 (N5000)
NT = non testé.

(1) Etalements sur lysine 100 mg/1, répliques sur TDL 0 et 1 mM, sur lysine 100 mg/1

(2) Etalements sur lysine : 1 g/1, répliques sur TDL 0 et 1 mM, lysine 100 et 1000 mg/1

On constate que les mutations portées par mg.118, mg.116 et mg.108, sont très liées à (lys1.13): on a admis que ces souches étaient modifiées comme mg.5 dans le "feedback" de la lysine sur l'homocitrate synthétase. L"effet (lys1.13)" variable s'expliquant sans doute par une déstabilisation plus ou moins grande de l'enzyme actif insensible, par l'enzyme mutant.

On trouve que dans la descendance de mg.102 x 8024.9 il y a un important déficit de lys^-. Ce phénomène peut être du à la présence de gènes modificateurs dans mg.102 (on n'a pas observé d'anomalies dans le nombre de spores par asque), on peut par exemple imaginer que la moitié

des spores lys⁻ ne germent pas quand elles sont combinées à ce gène. On a repris l'étude de ce phénomène sur deux autres diploïdes mg.103 x 8024.9 et mg.113 x 8024.9 : la descendance a été étalée sur de fortes concentrations de lysine dans le but de "forcer" l'entrée de cet acide aminé. On voit dans le tableau 55 que la classe manquante réapparaît sur lysine 1 g/l (après un lag de 1 à 2 jours). Ces souches poussent sur YE et PSM supplémentés en lysine 1 g/l : on s'en est servi pour tester phénotypiquement l'allélisme des 18 souches phénotypiquement semblables à mg.103 et mg.113. On constate que tous les diploïdes résultant sont résistants à l'AEC et à la TDL 10^{-3}M, sauf ceux qui impliquent mg.106 et mg.128 (résistants à la TDL 10^{-3}M et sensibles à l'AEC 10^{-4}M).

Ces souches ont été croisées à 8051.13 (A, hisl.) pour vérifier qu'un seul gène était bien impliqué dans la résistance à la TDL. On a mis à sporuler les diploïdes mg.106 x 8024.9 et mg.128 x 8024.9 pour vérifier que la mutation de résistance n'affectait pas le transport de la lysine (voir tableau 56).

Tableau 56 - Etude des souches mg.106 et mg.128

Diploïdes		lys⁺TDL^R	lys⁺TDL^S	lys⁻100	lys⁻1000
mg 128 x 8051.12	(1)	66	59		
mg 106 x 8051.13	(1)	44	38		
mg 128 x 8024.9	(2)	32	28	35	22
mg 106 x 8024.9	(2)	34	37	33	29

Tous milieux supplémentés en uracile 100 mg/l

(1) Etalements sur N5000, répliques sur N5000 + TDL 1 mM

(2) Etalements sur N5000 + 1 g/l lysine, répliques sur TDL 0 et 1 mM, lysine 100 et 1000 mg/l

On constate qu'une seule mutation suffit à expliquer les ségrégations observées et qu'elle modifie vraisemblablement le transport de la lysine. On n'a pas poursuivi l'étude de ces mutations.

On en conclut que deux types de mutations conduisent principalement à l'apparition du phénotype TDL^R : celles qui affectent la sensibilité de l'homocitrate synthétase et celles qui modifient le transport de lysine. D'autres types de mutants pourraient sans doute être sélectionnés en modifiant les conditions de sélection. On peut en particulier espérer obtenir des mutations plus "efficaces" (c'est-à-dire conduisant à une plus forte accumulation de lysine) que (LYS1.5) dans des diploïdes sensibles à la TDL. Les premières expériences conduites dans ce sens sur un diploïde 1805 (W29 x Z30) se sont soldées par un échec : dans ce diploïde, "sensible à la TDL $5.10^{-5}M$" se développent très rapidement des clones résistants à $10^{-2}M$. Cette situation n'est pas générale : certains diploïdes sont inhibés de façon stable par la TDL (J.M.Beckerich, pers. comm.).

D. Etude de souches résistantes à l'AEC

a) Obtention de résistants dans mg.5

La souche mg.5 présente sur milieu solide une croissance lente sur AEC, même aux plus fortes concentration essayées ($3.10^{-2}M$). Des résistants apparaissent sous forme de colonies à croissance rapide, ils sont stables après un cycle de purification.

On a isolé 43 mutants indépendants à partir des souches 9301-14 (A, ade1., LYS1.5) et 102-4 (B, his1., LYS1.5) : on les a appelés respectivement AEC^R x1 à AEC^R x25 et AEC^R x26 à AEC^R x43. Ils ont été testés sur AEC 10 mM, lysine source de carbone en N100 et N5000. Deux groupes phénotypiques peuvent être définis : les mutants de type AEC R1 ont des phénotypes différents selon la concentration en ammonium, les mutants de type AEC R2 ont le même phénotype quelle que soit la concentration d'ammonium présente dans le milieu (tableau 57).

../..

Tableau 57 - Croissance des mutants AEC^R induits dans des souches TDL^R

Souche mère	Nbre de mutants		N100		N5000	
			aec 10mM	lysC	aec 100mM	lysC
9301-14	AEC R1	8	+/- à -	+ à +/-	+	+/- à -
	AEC R2	17	+	+ à +/-	+	+ à +/-
102-4	AEC R1	4	+/- à -	+	+	+/- à -
	AEC R2	14	+	+	+	+

Tout ce passe comme si dans les mutants de type AEC R1 l'inhibiteur et la lysine rentraient mieux quand l'ammonium est limitant. Leur croissance sur arginine source de carbone est moins bonne que celle des souches de départ : on peut supposer qu'ils sont affectés dans le transport de la lysine (analogie avec certains mutants de transport de J.M. Beckerich).

b) Etude génétique des mutants AEC R

On a confronté tous les mutants induits dans 9301-14 et 102-4 entre eux et par les souches 9301-14 et 102-4 pour déterminer le nombre de groupes de complémentation et les relations de dominance dans des diploïdes homozygotes pour (LYC1.5). Tous les diploïdes ont été testés sur AEC 10^{-2}M en N5000. On peut distinguer trois classes de mutants AEC R2, dont l'une est par ce test indiscernable de AEC R1 (tableau 58).

On constate que si les groupes de complémentation ainsi définis (AEC R1 et AEC R2-3 confondus) représentent chacun un locus, on a obtenu à peu près autant de mutants pour chaque groupe. Pour définir de nouveaux groupes de complémentation, il faudrait sans doute changer de mode de sélection ou de souche.

../..

Tableau 58 - Complémentation et récessivité des mutants AEC^R dans des diploïdes homozygotes pour (LYS1.5)

102-4 / 9301-14	AEC R 1 (4)	AEC R 2-1 (6)	AEC R 2-2 (7)	AEC R 2-3 (1)	+
(8) AECR 1	-	+	+	-	+
(8) AECR 2-1	+	-	+	+	+
(7) AECR 2-2	+	+	-	+	+
(2) AECR 2-3	-	+	+	-	+
+	+	+	+	+	+

+ = Complémentation ou sensibilité à l'AEC 10 mM.
Entre parenthèses, nombre de souches par groupe de complémentation

On a testé la ségrégation de deux diploïdes pour chacun de groupes de complémentation définis ci-dessus (pas d'isolement à la paraffine) sur une vingtaine de descendants ade^- et autant his^-, (voir tableau 59)

Malgré la faiblesse des effectifs testés dans chaque cas, on peut admettre, vu l'homogénéité des résultats, que le déterminisme de la résistance est monogénique, et que les mutations correspondant aux classes AECR 1 et AECR 2-3 sont très liées et indépendantes des mutations non liées impliquées dans les classes AECR 2-1 et AECR 2-2.

../..

Tableau 59 - Analyse de descendance de diploïdes homozygotes pour (LYS1.5), hétérozygotes pour la mutation de résistance à l'AEC

Diploïde	Phénotype des souches croisées	Auxotrophes AEC^R	Auxotrophes AEC^S
9301-14x1 × 102-4x23	AEC R 1 × AEC R 1	40	0
9301-13x1 × 102-4x19	AEC R 1 × AEC R 2-1	18	7
9301-14x1 × 102-4x42	AEC R 1 × AEC R 2-2	33	12
9301-14x6 × 102-4x36	AEC R 1 × AEC R 2-3	81	0
9301-14x6 × 102-4	AEC R 1 × +	16	24
9301-14x4 × 102-4x23	AEC R 2-1 × AEC R 1	28	12
9301-14x12 × 102-4x19	AEC R 2-1 × AEC R 2-1	38	0
9301-14x4 × 102-4x32	AEC R 2-1 × AEC R 2-2	34	16
9301-14x4 × 102-4x36	AEC R 2-1 × AEC R 2-3	29	11
9301-14x3 × 102-4x27	AEC R 2-2 × AEC R 1	25	15
9301-14x3 × 102-4x19	AEC R 2-2 × AEC R 2-1	33	13
9301-14x9 × 102-4x32	AEC R 2-2 × AEC R 2-2	62	0
9301-14x3 × 102-4x36	AEC R 2-2 × AEC R 2-3	35	12
9301-14x17 × 102-4x23	AEC R 2-3 × AEC R 1	46	0
9301-14x17 × 102-4x19	AEC R 2-3 × AEC R 2-1	27	13
9301-14x11 × 102-4x32	AEC R 2-3 × AEC R 2-2	33	9
9301-14x11 × 102-4x36	AEC R 2-3 × AEC R 2-3	52	0
9301-14x11 × 102-4	AEC R 2-3 × +	18	22
9301-14x3 × 102-4	AEC R 2-2 × +	16	24
9301-14x4 × 102-4	AEC R 2-1 × +	21	25

On a recherché, comme précédemment, pour les mutant TDL^R, si la résistance de certaines souches pouvait s'expliquer par une modification du transport de la lysine (voir tableau 60).

../..

Tableau 60 - Recherche de mutations modifiant le transport de la lysine dans les souches AEC R1, AEC R2-1 AEC R2-2 et AECR2-3

Diploïdes testés	Phénotype de la souche AEC^R testée	lys^+AEC^R	lys^+AEC^s	lys^-100	lys^-1000
9301.14x6 × 8024.10	AEC R 1	45	48	97	0
9301.14x1 × 8024.10	AEC R 1	22	24	36	0
9301.14x11 × 8024.10	AEC R 2-3	27	29	18	26
9301.14x17 × 8024.10	AEC R 2-3	13	9	17	7
9301.14x4 × 8024.10	AEC R 2-1	36	37	68	0
9301.14x3 × 8024.10	AEC R 2-2	29	25	61	0

Tous les mutants sont supplémentés en adénine. 8024.10 (B,lys1.13)

On constate que seules les souches AECR 2-3 sont affectées dans le transport; il est possible que les souches AECR 1, AECR 2-1 et AECR 2-2 soient altérées dans le métabolisme de la lysine ou que la modification du système de transport soit trop faible pour être décelée par ce test. Dans ce dernier cas, on s'attend à ce que la résistance à l'AEC dépende de la présence de (LYS1.5) dans la souche (effet du "pool" sur le transport).

On a donc croisé un représentant de chaque classe par 105.1 (B,ura2.) et analysé la descendance des diploïdes résultants (voir tableau 61).

On constate que l'expression de la mutation de résistance portée par les souches AECR 2-2 et AECR 2-2 est indépendante de la présence de (LYS1.5) tandis que la classe TDL^s AEC^R manque dans la descendance des hétérozygotes (aec1.,LYS1.5) et (aec2-1, LYS1.5). On peut supposer que les souches AECR 1 sont affectées de façon partielle dans le système de transport de sorte que les doubles mutants (aec1., lys1.13) poussent sur lysine 100 mg/l mais qu'en l'absence d'un "pool" élevé de lysine, l'entrée de l'AEC est suffisante pour inhiber la croissance. Cette hypothèse pourrait être vérifiée directement en comparant "l'uptake" de lysine des souches AECR 1, AECR 2-3

et de la souche mère. Il en va peut-être de même pour AECR 2

Les souches de type AECR 2-2 ne semblent pas affectées au ni veau du transport de la lysine, leur résistance peut être dûe à une modification interne.

Tableau 61 - Influence de (LYS1.5) sur le phénotype des souches AEC^R

Diploïdes testés	Phénotype AEC^R de la souche testée	Phénotypes des descendants			
		TDL^RAEC^R	TDL^RAEC^S	TDL^SAEC^R	TDL^SAEC
9301-14x6 × 105.1	AEC R 1	13	18	0	36
9301-14x1 × 105.1	AEC R 1	25	17	0	40
9301-14x17 × 105.1	AEC R 2-3	19	12	23	15
9301-14x11 × 105.1	AEC R 2-3	24	36	22	28
9301-14x4 × 105.1	AEC R 2-1	14	10	0	21
9301-14x12 × 105.1	AEC R 2-1	21	27	0	39
9301-14x3 × 105.1	AEC R 2-2	17	21	13	18
9301-14x9 × 105.1	AEC R 2-2	27	28	22	25

Tous les milieux sont supplémentés en adénine et uracile
AEC et TDL 1 mM

c) Etude enzymatique des souches AEC^R

Dans ce qui suit, on supposera qu'on a effectivement défini trois loci qui confèrent la résistance à l'AEC et on désigne les souches par leur génotype (aec 2-1, aec 2-2) suivi du numéro d'isolement. Pour des raisons de commodité, on a conservé les dénominations (aec 1.) et (aec 2-3.). On a recherché sur ces souches.

- une variation de l'activité spécifique des enzymes qu'on savait doser.
- une diminution de la répression de la SDH par la lysine
- une variation du "pool" de lysine libre.
- une excrétion de lysine dans le milieu.

../..

Les résultats sont rapportés dans le tableau 62 et comparés à ceux qu'on a obtenus sur la souche mère 9301-14 (A, ade1, LYS1.5).

Tableau 62 - Recherche d'un effet des mutations AEC^R sur le métabolisme de la lysine

Souches testées (génotypes)	Culture sur MM						Culture s/lysine 5mM	
	Pool de lysine (1)	Excrétion (2)	HS (3)	AAR (4-5)	AASAGR (4)	SDH (4)	Pool de lysine (1)	SDH (4)
(A,ade1.,LYS1.5)	168	< 0,01	0,026	10	20	222	326	113
(A,ade1.,LYS1.5,aec1.x6	153	< 0,01	0,027	9,5	21	234	301	129
(A,ade1.,LYS1.5,aec2-1.x4)	143	< 0,01	0,028	10	19	234	332	115
(A,ade1.,LYS1.5,aec2-2.x3)	164	< 0,01	0,031	10	19,5	229	319	119
(A,ade1.,LYS1.5,aec2-2.x9)	168	< 0,01	0,025	10	20	227	337	115
(A,ade1.,LYS1.5,aec2-3.x11)	176	< 0,01	0,024	9,5	19,5	221	199	196
(A,ade1.,aec2-3.x11)	32	< 0,01	0,031	10,5	20	316	66	238
(A,ade1.,aec2-2.x3)	33	< 0,01	0,028	10	20	327	296	137
(B,ade1.,aec2-2.x9)	31	< 0,01	0,030	10	20	320	298	132
(A,ade1.)	30	< 0,01	0,025	10	20	324	311	126

(1) Exprimé en µmoles par g. de poids sec

(2) en mM lysine

(3) en ΔdO 412 nm/mn/mg de protéines

(4) en nmoles de coenzyme/mn/mg de protéines

(5) On a déterminé l'activité AAR également par le pDMABA sur la souche mère et les souches AECR 2-2 sans trouver de variation d'activité.

D'une façon générale, les activités HS, AAR, AASAGR ne sont pas modifiées par les mutations étudiées. L'activité HS est dans tous les cas légèrement inférieure à celle qu'on mesure sur la souche W29 : il peut s'agir d'un effet d'anisogénie ou plus spécifiquement de la mutation (ade1.).

Les "pools" de lysine sur milieu non enrichi en cet acide aminé sont également supérieurs dans tous les cas à ce qu'on observe sur les souches W29 et mg.5 (valeurs moyennes respectives 20 et 100 µmoles de lysine (g. de poids sec). Il n'y a aucun effet des mutations étudiées. Sur milieu enrichi en lysi la taille du "pool" s'élève dans tous les cas à une valeur voisine ou légèrement supérieure à celle qu'on aurait déduite de la fig.31, sauf quand les souches contiennent (aec2-3.x11) seul ou en combinaison avec (LYS1.5): il semble bien que cette mutation modifie l'entrée de la lysine. On n'observe pourtant aucune excrétion.

Si on considère la "répression" de la SDH, on voit qu'elle est voisine de celle qu'on observe dans les souches mères, dans toutes les souches ne contenant pas (aec2-3.x11). Si on considère les souches (A, ade.) sur MM et la souche (A, ade1., aec2-3.x11) sur 5 mM lysine, on constate que le "pool" passe de 30 à 66 µmoles de lysine /g poids sec. D'après la fig.31, on attend dans ces conditions une "répression" de la SDH comprise entre 30 et 35%, soit une activité spécifique voisine de 220-230 nmoles NADP/mn/mg de protéines. Il ne semble donc pas que la mutation (aec 2-3.) étudiée modifie significativement la répression de la SDH.

d) Conclusion

On n'a pu préciser dans aucun des cas étudiés le mécanisme de la résistance observée dans des souches AEC^R (LYS1.5). Il est probable que certaines des mutations décrites affectent le transport de la lysine. On n'a pas essayé de caractériser ce type de mutations, à la fois parce qu'il était étudié par ailleurs au laboratoire et parce qu'il n'apportait rien à l'étude de la régulation de la biosynthèse.

Plusieurs mécanismes de résistance n'ont pas été testés en dehors d'une modification de la spécificité d'un transporteur détoxification de l'AEC, effet sur le branchement hypothétique de la voie ou au niveau des tRNA syntéhtases par exemple.

Une modification,trop faible pour être appréciée par les techniques utilisées, des mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse pourrait peut-être suffire à produire un phénotype AEC^R dans une souche qui accumule de grandes quantités de lysine.

Dans ce cas, l'utilisation au départ, d'une souche porteuse de (LYS1.5) apparaît criticable. Cette méthode a été choisie pour éviter une resélection indirecte de mutations allèles de (LYS1.5) et dans un but pratique (recherche de souches "supe accumulatrices"). L'analyse de souches AEC^R dérivées d'un parent ($lys1.5^+$) n'en est qu'à ses débuts. En dehors de nombreuses mutations du système de transport de la lysine (J.M. Beckerich, pers. Commun.) on n'a obtenu que trois souches non modifiées dans le transport. L'une porte vraisemblablement une mutation allèle de (LYS1.5), les deux autres ont un "pool" de lysine et des activités HS, AAR et SDH non modifiées.

On pourrait donc envisager d'utiliser le 3ème mode de sélection décrit dans l'introduction :

- Sélection d'AEC^R ou de résistants à l'hydroxamate de lysine dans une souche (lys1.13) cultivée sur aminoadipate.
- Sélection de résistants dans un révertant partiel de (LYS1.5, lys5.12B) pour obtenir spécifiquement des mutants de dérépression de la SDH (voir Cassan et al. 1975).

Conclusion de la 3ème partie

L'étude de la régulation de la voie de biosynthèse de la lysine chez *S. lipolytica* n'en est clairement qu'à ses débuts. On n'a pour l'instant défini que deux systèmes soumis à une régulation spécifique, si on admet que les variations des taux de synthèse de l'AASAGR et de la SDH au sortir d'une phase de carence peuvent dépendre d'un effet métabolique général :

../..

- l'homocitrate synthétase qui est inhibée par la lysine et par d'autres composés éventuellement dérivés de la voie, et dont le taux de synthèse semble régulé, de façon peut-être indirecte, par l'αAASA. On n'a obtenu aucune indication d'un effet direct de la lysine à ce niveau.

- la saccharopine déshydrogénase qui est réprimée en présence de lysine, cette répression faisant intervenir, d'une façon qui reste à préciser, le système catabolique.

Dans toutes les conditions envisagées, la souche sauvage présente un niveau constant d'activité HS, considéré comme le niveau de base réprimé; il n'y a pas répression de l'HS dans les souches qui accumulent spontanément une quantité de lysine supérieure à celle de la souche sauvage, telles que (LYS1.5) ou (LYS1.5,lyc3.1). Cette activité ne diminue pas en phase stationnaire ni n'augmente au sortir de la phase de latence, contrairement par exemple aux activités AASAGR, AAR et SDH. Cette observation ne laisse pas de poser un problème pour l'instant non résolu. On peut admettre à titre d'hypothèse que la production de lysine (et d'intermédiaires) est assurée en croissance végétative par ce niveau de base, l'ajustement des quantités produites aux besoins se faisant surtout par rétroinhibition à ce niveau, comme le montre l'effet d'une mutation (LYS1.5). Dans certaines conditions à déterminer (conjugaison, sporulation ?), la production de lysine pourrait ne plus être le rôle principal de la voie : il y aurait réorientation du métabolisme des intermédiaires, arrêt ou augmentation de leur production, nécessitant une dérépression de l'homocitrate synthétase. La dérépression de l'HS mesurée au cours de la croissance végétative de certains mutants lys^- serait alors la transposition, en phase végétative, de phénomènes anormaux dans cet état physiologique, non contrôlés par la lysine. Il faut remarquer à ce sujet qu'on a supposé que l'α AASA était impliqué dans la "répression" de l'HS dans les conditions étudiées; on peut souligner cependant que ce composé est instable et qu'il ne semble pas s'accumuler dans nos souches. On peut aussi imaginer qu'il s'agi en fait d'un dérivé de l'α AASA qui est l' "inducteur" de l'HS, mais que sa formation

n'a lieu que dans certains mutants (nécessité de la recherche et de l'étude d'une activité régénératrice d'α AASA).

Le rôle de la SDH et de l'AASAGR serait plus spécifique de la production de lysine. On peut cependant s'interroger sur la signification physiologique de la répression de la SDH observée en présence de lysine: non totale, incapable de masquer l'effet d'une mutation de type (LYS1.5), elle n'est accompagnée par aucune répression des activités HS, AAS et AASAGR. On peut imaginer qu'il est moins désavantageux pour la cellule d'assurer la synthèse d'enzymes excédentaires dont l'activité in vivo est modulée rapidement par la concentration d'intermédiaires disponibles (grâce au rétrocontrôle sur l'HS) que de devoir faire face à des répressions ou des dérépressions qui conduiraient à des oscillations du "pool" de lysine : celui-ci jouerait un rôle d'indicateur sur l'état du métabolisme (azoté ou général) comme l'indiquent certaines études sur *S. cerevisiae* (Bourgeois 1972). Les variations de celui-ci s'accompagnent d'ailleurs chez *S. lipolytica* de plusieurs phénomènes inexpliqués : "induction" simultanée de l'AASAGR et de la SDH, accumulation de thréonine, excrétion d'acide citrique entre autres.

On retrouverait ainsi, quoique très partiellement, certaines des conclusions de Tucci et Ceci (1972b) sur *S. cerevisiae*, qui postulèrent que seule la seconde partie de la voie, spécifique de la lysine, est contrôlée par cet acide aminé. Il est encore impossible de préciser si cette situation reflète réellement des rôles disctincts pour chaque partie, ou si elle n'est due qu'au passé évolutif de cette chaîne de biosynthèse. La première partie de la voie, à localisation mitochondriale chez *S. cerevisiae*, aurait servi à la production de dérivés inconnus, la seconde partie correspondant en fait à une voie de dégradation modifiée (voir Miller et Rodwell, (1971) pour le catabolisme de la lysine chez *Pseudomonas putida*). L'α aminoadipate qui, chez *S. cerevisiae* est produit à la fois par un enzyme cytoplasmique et un enzyme mitochondrial, serait le point de convergence des deux chaînes. On aurait alors chez *S. lipolytica* un stade évolutif précoce :

absence d'isoenzymes (fonctionnels) pour l'HS, contrôle du taux de synthèse des enzymes précoces par un intermédiaire ou un dérivé, des enzymes tardifs par la lysine et intégration des deux parties par un rétrocontrôle de la lysine sur le premier enzyme.

Aucun support expérimental ne peut encore confirmer ces hypothèses finalistes : une meilleure connaissance des mécanismes de régulation proposés, des enzymes impliqués dans le métabolisme des intermédiaires (et de leurs dérivés possibles) devrait permettre une interprétation plus justifiée de ces premiers résultats.

RESUME ET CONCLUSIONS

La levure *S. lipolytica* est typiquement haplodiplobiontique, ce qui permet l'étude de l'expression des divers phénotypes à l'état haploïde et diploïde. Les techniques génétiques mises au point permettent d'obtenir un grand nombre de mutants et d'en étudier le déterminisme. La totalité d'un cycle peut être accomplie en 10 à 20 jours, ce qui permet la réalisation rapide d'études génétiques. Les souches isolées de la nature présentent un polymorphisme prononcé : l'obtention de clones compatibles présentant des différences génétiques simples à analyser ne peut être réalisée qu'après isogénisation au moins partielle des souches à tester à des souches de référence. Sur des souches "isogénisées" il est alors possible d'étudier l'effet spécifique d'une mutation. La carte fine de certains gènes a été explorée, on n'a pas rencontré de difficultés plus grandes que sur une levure mieux connue, du type *S. cerevisiae*.

L'objectif initial de ce travail était l'étude de la génétique de *S. lipolytica*. On peut affirmer qu'il a été atteint. Cette levure est maintenant"apprivoisée", le problème qui se pose est de savoir s'il vaut la peine de la domestiquer, afin qu'elle fasse partie intégrante du matériel génétique utilisable. Il faut pour cela que ce nouvel organisme se prête bien à l'expérimentation, et qu'il conduise à des résultats qui ne puissent être obtenus avec d'autres espèces actuellement utilisées.

En dehors de son éventuel intérêt appliqué que nous discuterons plus bas, il faut tout de suite remarquer qu'un organisme nouveau peut constituer, de par ses caractéristiques spécifiques un matériel intéressant, aux possibilités nouvelles. C'est ainsi par exemple que l'étude de la biosynthèse de la lysine est facilitée par l'absence d'isoenzymes et qu'une approche des

mécanismes de dégradation de cet acide aminé est rendue plus aisée par l'existence d'une voie unique de catabolisme. Plus généralement on pourra comparer les mécanismes mis en jeu dans trois genres de levures différents, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces et Saccharomycopsis*. Signalons à ce sujet que le laboratoire du Docteur Williamson s'intéresse aux souches de *S. lipolytica* haploïdes et diploïdes pour l'étude de la réplication de l'ADN mitochondrial et que, dans ce laboratoire, J.M. Beckerich a comparé les caractéristiques du transport de la lysine chez *S. lipolytica* à celle de *S. cerevisiae*. Enfin *S. lipolytica* pourrait constituer un matériel intéressant pour l'étude de la différenciation cellulaire : contrôle du dimorphisme végétatif ou de la transition entre les respirations cyanure-sensible et cyanure-insensible...

Le second objectif de ce travail concernait le métabolisme de la lysine, préalable indispensable à l'obtention de souches excrétrices. L'étude de ce problème est loin d'être terminée, nous ne rappellerons ici que les principaux résultats qui ont déjà été discutés à la fin des chapitres correspondants. L'essentiel du contrôle de la voie de biosynthèse de la lysine est réalisé par un rétrocontrôle de cet acide aminé au niveau du premier enzyme. D'autres mécanismes existent qui tendent soit à coordonner les vitesses de catabolisme aux vitesses d'accumulation (cas de l'interrelation saccharopine déshydrogénase - lysine acétyltransférase), soit à réguler la production d'intermédiaires ou de dérivés encore inconnus de la voie (inhibition du premier enzyme par des produits non analogues de la lysine, rôle éventuel de l'aminoadipate semialdéhyde dans le contrôle de la dérépression de l'homocitrate synthétase). On n'a pour l'instant caractérisé que des mutants de rétrocontrôle, qui présentent le double intérêt d'accumuler de la lysine et d'excréter de l'acide citrique (souche mg-5).

L'étude de mutants du catabolisme se justifie par l'intérêt pratique que présentent les souches incapables de réutiliser la lysine produite. Celles-ci accumulent davantage de lysine que

../..

la souche sauvage quand on les cultive sur paraffine. La combinaison d'une mutation du rétrocontrôle et d'une mutation du catabolisme permet d'obtenir des souches qui accumulent dix fois plus de lysine libre que la souche sauvage. Ce rapport devrait être amélioré si de nouveaux mutants de régulation sont obtenus.

L'obtention de souches excrétrices semble poser des problèmes plus délicats. Un essai de sélection directe à partir de souches accumulatrices a révélé un phénotype particulier (mutants lex$^-$) dont l'étude reste à faire, mais les souches obtenues sont instables et excrètent peu de lysine (1 g/l en fermenteur, G. Sylvestre, comm. pers.). On pouvait espérer de meilleurs résultats avec une souche qui combinerait une mutation de rétrocontrôle, un bloc du catabolisme et une mutation de perméatio (isolée par J.M. Beckerich) - souche (LYS1.5, lyc3.1, tac8.). Les excrétions de lysine mesurées en fioles restent cependant faibles (100 mg/l), peut-être parce que la mutations de transport utilisée n'affecte pas tous les systèmes d'entrée de la lysine.

On peut espérer obtenir de nouveaux mutants de régulation et des souches affectées dans la membrane cytoplasmique. Certains sont à l'étude en ce moment, mais comme on sait par ailleurs que les "pools" d'acides aminés des levures sont compartimentés, il serait aussi intéressant d'isoler des mutants de stockage (mutants vacuolaires ?) différents des mutants lex$^-$ obtenus jusqu'ici. Différentes approches à ce problème sont envisagées et seront prochainement mises en oeuvre.

La poursuite de ce travail devrait apporter des résultats qui, tant sur les plans fondamental que pratique, pourront, a posteriori, justifier l'intérêt porté à cette levure.

° ° °
°

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ASPEN A.J. & MEISTER A. (1962). Conversion of αaminoadipic acid to L-pipecolic acid by *Aspegillus nidulans*.Biochemistry 1, 606-612.

ABRAHAM E.P. & NEWTON G.G.F. 51967). Penicillins and cephalosporins. *In*"Antibiotics 2, 1-16. Gottlieb D. & Shaw P.D. éd., Springer Verlag, New-York.

BACKUS M.P. & STAUFFER J.F. (1955). The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. Mycologia 47, 429.

BALLERINI D. (1970) Etude descriptive et cinétique de la croissance d'une levure *Candida lipolytica* à partir d'alcanes normaux. Thèse d'Ingénieur Docteur, Faculté des Sciences Paris.

BARTHELMESS I.B., CURTIS C.F., KACSER H. (1974). Control of the flux to arginine in *Neurospora crassa*: derepression of the last three enzymes of the pathway. J. Mol. Biol. 87, 303-316.

BASSEL J., WARFEL J. & MORTIMER R.K. (1971) Complementation and genetic recombination in *Candida lipolytica*. J. Bacteriol. 108,, 609-611.

BECKERICH J.M. (1975). Etude du transport de la lysine chez *Saccharomycopsis lipolytica*. Thèse de 3e cycle, Orsay.

BETTERTON H., FJELLSTEDT T., MATSUDA M., OGUR M. & TATE R. (1968). Localization of the homocitrate pathway. Biochim. Biophys. Acta 170, 459-461.

BHATTACHARJEE J.K. (1970). Leaky mutations and coordinate regulation of the accumulation of lysine precursors in *Saccharomyces*. Can. J. Genet. Cytol. 12, 785-789.

BHATTACHARJEE J.K. & SINHA A.K. (1971). Relationships among genes, enzymes and intermediates of the biosynthetic pathway of lysine in *Saccharomyces*. Molec. Gen. Genet. 115, 26-30.

BHATTACHARJEE J.K. & STRASSMAN M. (1967). Accumulation of tricarboxylic acids related to lysine biosynthesis in a yeast mutant. J. Biol. Chem. 242, 2542-2546.

BISWAS G.D. & BHATTACHARJEE J.K. (1974). Isolation and complementation of lysine auxotrophs in *Saccharomyces*. Ant. van Leeuwenhoek 40, 221-231.

BOURGEOIS C.M. (1972). Influence de la lysine sur la croissance et sur le métabolisme des polyamines chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Sciences Naturelles, Paris VII.

BROCK T.D. (1961) Physiology of the conjugation process in *Hansenula wingei*. J. Gen. Microbiology 26, 487-497.

BROOKES P. & LAWLEY P.D. (1964). Reaction of some mutagenic and carcinogenic compounds with nucleic acids. J. Cell. Comp. Physiol. 64 (suppl. 1) 11-118.

BURTON R.K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62, 315-323.

CASKEY C.T., ASHTON D.M. & WYNGAARDEN J.B. (1964). The enzymology of feed-back inhibition of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by purine nucleotides. J. Biol. Chem. 239, 2570-2579.

CASSAN M., BOY E., BORNE F. & PATTE J.C. (1975). Regulation of the lysine biosynthetic pathway in *Escherichia coli*: isolation of a cis-dominant constitutive mutant for AK III synthesis. J. Bacteriol. 123, 391-399.

CHILINA K., THOMAS U., TUCCI A.F., Mc MICHAEL K.D. & STEVENS C.M. (1969). Synthesis and absolute configuration of the isomers of homoisocitric acid (1-hydroxy-1-2-4-butanetricarboxylic acid) and the stereochemistry of lysine biosynthesis. Biochemistry 8, 2846-2855.

CIFERI O., SORA S. & TIBONI O. (1969). Effect of gene dosage on tryptophan synthetase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 61, 567-576.

CLAVILLIER L. (1962). Recherches sur la spécificité génétique de l'inhibition par l'histidine des réversions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de 3e cycle Paris.

COWIE D.B. & Mc CLURE F. (1959). Metabolic pools and the synthesis of macromolecules. Biochim. Biophys. Acta 31, 236-245.

CRANDALL M.A. & BROCK T.D. (1968). Bact. Rev. 32, 139-163.

CRICK F.H.C. & ORGEL L.E. (1964). The theory of intraallelic complementation. J. Mol. Biol. 8, 161-165.

CYBIS J. & WEGLENSKI P. (1972). Arginase induction in *Aspergillus nidulans*. The appearance and decay of the coding capacity of messenger. Eur. J. Biochem. 30, 262-268.

FOOR F., JANSEN K.A. & MAGASANIK B. (1975). Regulation of synthesis of glutamine synthetase by adenylated glutamine synthetase. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 4844-4848.

FOWELL R.R. (1952). Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. Nature 170, 578.

FOWELL R.R. (1969). Sporulation and hybridization of yeasts. In "The Yeasts", A.H. Rose et J.S. Harrisson éd., Academic Press Inc., New-York.

FUJIOKA M. & NAKATANI Y. (1970). A kinetic study of saccharopine dehydrogenase reaction. Eur. J. Biochem. 16, 180-186.

GUENGUERICH F.P., SNYDER J.J. & BROQUIST H.P. (1973). Biosynthesis of slaframine (1S-6S-8aS)-1-acetoxy-6-aminooctohydroindolizine, a parasympathomimetic alkaloïd of fungal origin. I Pipecolic acid and slaframine biosynthesis. Biochemistry 12, 4264-4269.

GOLBERGER R.F. (1974) Autogenous regulation of gene expression. Science 183,810-81

GRAY B.H. & BERNLOHR R.W. (1969). The regulation of aspartokinase in *Bacillus licheniformis*. Biochim. Biophys. Acta 178, 248-261.

GRENSON M., HOU C. & CRABEEL M. (1970). Multiplicity of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV Evidence for a general aminoacid permease. J. Bacteriol. 103, 770-777.

HENRY M.F., HAMAIDE-DEPLUS M.C. & NYNS E.J. (1974). Cyanide insensitive respirati of *Candida lipolytica*. Ant. van Leeuwenhoek 40, 79-91.

HERMAN A.I. (1971). Mating responses in *Candida lipolytica*. J. Bacteriol. 107,371

HILGER F., CULOT M., MINET M., PIERARD A., GRENSON M. & WIAME J.M. (1973). Contro of the kinetic of the enzyme mediating arginine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 75, 33-41.

HIGASHINO K., TSUKADA K. & LIEBEMAN I. (1965). Biochem. Biophys. res. Commun. 20, 285-290.

HOAGLAND M.G., KELLER E.B. & ZAMECNICK (1956) J. Biol. Chem. 218, 345.

HOGG R.W. & BROQUIST H.P. (1968) Homocitrate formation in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 243,1839-1845.

HORN P. & WILKIE D. (1966) Use of Magdala red for the detection of auxotrophic mu tants in *Saccharomyces cerevisiae*.J. Bacteriol. 91, 1388.

HUNTER D.R. & SEGEL I.H. (1971) Acidic and basic aminoacid transport systems in *Penicillium chrysogenum*.Arch. Biochem. Biophys. 144, 168-183.

HWANG Y.L., LINDEGREN G. & LINDEGREN C.L. (1966) Genetic study of lysine biosynth sis in yeast. Can. J. Genet. Cytol. 8, 471-480.

IGUTI S. & ONUBU T. (1964) Bot. Magaz. Tokyo 77, 181-190.

JAKOB H. (1962) C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris 254, 3909-3911.

JOIRIS C.R. & GRENSON M. (1969) Specificité et régulation d'une perméase des acides aminés dicarboxyliques chez *Saccharomyces cerevisiae*. Soc. belge de Biochimie. Arch. Intern. Phys. Biochimie 77, 154-156.

KORCH C.T. (1970) Genetical and biochemical studies of complementation in the fir gene of histidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis, Univ. of California, Davis, California.

KORCH C.T. & SNOW R. (1973) Allelic complementation in the first gene of histidir biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.Genetics 74, 287-305.

KURTZ M. & BHATTACHARJEE J.K. (1975) Biosynthesis of lysine in *Rhodotorula glutir* role of pipecolic acid. J. Gen. Microbiol. 86, 103-110.

LAWTHER R.P. & COOPER T.G. (1973) Effects of inducer addition and removal upon th level of allophanate hydrolase in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biop Res. Commun. 55, 1100-1104.

LAWTHER R.P. & COOPER T.G. (1975). Kinetics of induced and repressed enzyme synth sis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 121, 1064-1073.

Z. allg. Path. Bakt.15, 1141-1146.

LIPMAN F. & TUTTLE L.C. (1945). J. Biol. Chem. 159, 21.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FAAR A.L. & RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent J. Biol. Chem. 193, 265-275.

MARAGOUDAKIS M.E., HOLMES H. & STRASSMAN M. (1967) Control of lysine biosynthesis in yeast by a feedback mechanism. J. Bacteriol. 93, 1677-1680.

MASSELOT M. & de ROBICHON-SZULMAJSTER H. (1975) Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisisae*. I Genetical analysis of auxotrophic mutants. Molec. Gen. Genet. 139, 121-132.

MATSUDA M. & OGUR M. (1969) Separation and specificityof the yeast glutamate-αketoadipate transaminase. J. Biol. Chem. 244, 3352-3358.

MATTOON J.R., MOSHIER T.A. & KREISER T.H. (1961) Separation and partial characteriz of a lysine precursor produced by a yeast mutant. Biochim. Biophys. Acta 51, 615-617.

Mc CLARY D.O., NULTY W.L. & MILLER E.R. (1959) Effects of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces* J. Bacteriol. 78, 362-368.

MEGNET R. (1965). Screening of auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces pombe* with 2-deoxyglucose. Mutation Res. 2, 328-331.

MEYERS M., LEVINTHAL M. & GOLDBERGER R.F. (1975) J. Bacteriol. 124, 1227-1235.

MILLER D.L. & RODWELL V.W. (1971) Metabolism of basic amino acids in *Pseudomonas putida*. Catabolism of lysine by cyclic and acyclic intermediates. J. Biol. Chem. 246, 2758-2764.

MITCHELL H.K. & HOULAHAN M.B. (1948) An intermediate in the biosynthesis of lysine in *Neurospora*. J. Biol. Chem. 174, 883.

MOAT A.G., PETERS N. & SRB A.M. (1959) Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics. J. Bacteriol. 77, 673-677

MORTIMER R.K., Brustadt T. & CORMACK D.V. (1965) Influence of linear energy transfer and oxygen tension on the effectiveness of ionizing radiations for induction of mutations and lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. Radiation Res. 26, 465-482.

MORTIMER R.K. & GILMORE R.A. (1968) Suppressors and suppressible mutations in yeast Adv. in Biol. and Med. Phys. 12, 319-331.

NABETA K., KOYAMA M. & SAKAMURA S. (1973) Identification of saccharopine and its lactam in Buckwheat seeds. Agr. Biol. Chem. 37, 1401-1406.

OGUR M., ROSHANMANESH A. & OGUR S. (1965) Tricarboxylic acid cycle mutants in *Saccharomyces*: comparison of independently derived mutants . Science 147 1590.

PARKER J.H. & SHERMAN F. (1969) Fine structure mapping and mutational studies of gene controlling yeast cytochrome c. Genetics 62, 9-22.

PETERS I.I. & NELSON F.E. (1948) Factors influencing the production of lipase in *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol.* 55, 581-591.

POLACCO P., JOSEPH C. & GROSS F. (1973) The product of the leu 3 cistron as a regu latory element for the production of the leucine biosynthetic enzymes of *Neurospora*. Genetics 74, 443-459.

PREVOST G. (1962) Etude génétique d'un Basidiomycète: *Coprinus radiatus* Fr. ex Bol Thèse ès Sciences Naturelles, Paris

RAMOS F., THURIAUX P., WIAME J.M. & BECHET J. (1970) The participation of ornithin and citrulline in the regulation of arginine catabolism in *Saccharomyces ce revisiae*. Eur. J. Biochem. 12, 40.

RANDERATH K. (1970) An evaluation of film detection methods for weak β emitters, particularly tritium. Anal. Biochem. 34, 188-205.

de ROBICHON-SZULMAJSTER H. (1967) Régulation du fonctionnement de deux chaînes de biosynthèse chez *Saccharomyces cerevisiae:* thréonine-méthionine et isoleuci valine. Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 1431-1462.

de ROBICHON-SZULMAJSTER H. (1969). In "The Yeasts", A.H. ROSE & J.S. HARRISSON éd. Academic Press Inc., New-York, vol 2, 332-418.

ROTHSTEIN M. & SAFFRAN E.M. (1963) Lysine biosynthesis in algae. Arch. Biochem. Biophys. 101, 373-377.

SAGISAKA S. & SHIMURA K.(1959) Enzymic reduction of α aminoadipic acid by yeast enzyme. Nature 184, 1709-1710.

SAGISAKA S. & SHIMURA K. (1960) Mechanism of activation and reduction of α amino adipic acid by yeast enzyme. Nature 186, 1189-1190.

SCHLESSINGER D. (1974)Genetic and antibiotic modification of protein synthesis. Ann. Rev. Genet. 8, 135-154.

SCHURCH A., MIOZZARI J. & HUTTER H. (1974) Regulation of tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mode of action of 5-methyltryptophan and on 5-methyltryptophan sensitive mutants. J. Bacteriol. 117, 1131-1140.

SHERMAN F. (1963) Respiration deficient mutants in yeast. I Genetics. Genetics 48, 375-385.

SHIMURA I. & VOGEL H.H. (1966) Diaminopimelate decarboxylase of *Lemna perpusilla*: partial purification and some properties. Biochim. Biophys. Acta 118, 396-40

SINHA A.K. & BHATTACHARJEE J.K. (1971) Lysine biosynthesis in *Saccharomyces*. Conversion of α aminoadipate into aminoadipatesemialdehyde. Biochem. J. 125, 743-749.

SLONIMSKI P.P., ACHER R., PERE G., SELS A. &SOMLO H. (1965) Eléments du système res piratoire et leur régulation: cytochromes et isocytochromes. In " Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes", éd. CNRS, Paris, 435-461.

SRERE P.A. , BRAZIL H. & GONEN L. (1963) Acta Chem. Scand. 17, S. 129.

SUBRANAMIAN K.N.,WEISS R.L. & DAVIS R.H. (1973) Use of external, biosynthetic and organellar arginine by *Neurospora*. J. Bacteriol. 115, 284-290.

SURDIN-KERJAN Y. & de ROBICHON-SZULMAJSTER H. (1975) Existence of two levels of repression in the biosynthesis of methionine in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of lomofungin on enzyme synthesis. J. Bacteriol. 122,367-374.

STRASSMAN M. & WEINHOUSE S. (1953) The biosynthesis of lysine by *Torulopsis utilis*. J. Amer. Chem. Soc. 75, 1680-1684.

STRASSMAN M. & CECI L.N. (1964) Enzymatic formation of homocitric acid, an intermediate of lysine biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 262-267.

STRASSMAN M. & CECI L/N/ (1965) Enzymatic formation of α ketoadipic acid from homocitric acid. J. Biol. Chem. 240, 4357-4361.

STRASSMAN M. & CECI L.N. (1966) Enzymatic formation of cis-homoaconitic acid, an intermediate in lysine biosynthesis in yeast. J. Biol. Chem. 241, 5401-5407.

TABUCHI T., TANAKA M. & ABE M. (1969) Production of citric acid by *Candida lipolytica* strain n° 228. J. Agr. Biol. Chem. Soc. Japan 43, 154-158.

TANNENBAUM S.W. & KANEKO K. (1964) Biosynthesis of dipicolinic acid and of lysine in *Penicillium citreoviride*. Biochemistry 3, 1314-1322.

TRACY J.W. & KOLHAW G.B. (1975) Reversible, coenzyme-A mediated inactivation of biosynthetic condensing enzymes in yeast: a possible regulatory mechanism. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1802-1806.

THOMAS U. , KALYANPUR M.G. & STEVENS C.M. (1966) Biochemistry 5, 2513.

TRUPIN J.S. & BROQUIST H.P. (1965) Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic pathway of lysine biosynthesis. J. Biol. Chem. 240, 2524-2530.

TSUGAWA R., NAKASE T., KOYABASHI T., YAMASHITA K. & OKOMURA S. (1969) Fermentative production of α ketoglutaric acid by *Candida lipolytica*.Agr. Biol. Chem. 33, 158-167.

TUCCI A.F. & TUCCI L.N. (1972a) Homocitrate synthase from yeast. Arch. Biochem. Biophys. 153, 742-750.

TUCCI A.F. & TUCCI L.N. (1972b) Control of lysine biosynthesis in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 153, 751-754.

UMBARGER H.E. (1969) Regulation of aminoacid metabolism. Annu. Rev. Biochem. 38, 323-370.

VOGEL H.J. (1965) Lysine biosynthesis and evolution. In " Evolving genes and protein", éd. V. BRYSEN & H.J. VOGEL, Academic Press Inc., New-York.

WIAME J.M. (1971) The regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: exclusion mechanisms."Current topics in cellular regulations", Academic Press Inc., New-York, 4, 1-38.

WICKERHAM L.J. (1951) Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin of the US department of agriculture, Washington 1029, 1-56.

WICKERHAM L.J., KURTZMAN C.P. & HERMAN A.I. (1969)Sexuality in *Candida lipolytica*. Recent trends in yeast research, Miner Institute, Chazy éd. New-York.

WIEMKEN A. &DURR M. (1974) Characterization of aminoacid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 101, 45-57.

WINGE O. & ROBERTS C.C.(1958) The chemistry and biology of yeasts. A.H. COOK éd.

WOLFNER M., YEP D., MESSENGUY F. & FINK G.R. (1975) Integration of aminoacid biosynthesis into the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 96, 273-290.

YARROW D. (1972) Four new combinations in yeasts. Ant. van Leeuwenhoek 38, 357-360.

YATES R.A. & PARDEE A.B. (1956) Control of pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli* by a feed-back mechanism. J. Biol. Chem. 221, 757.

ZIMMERMANN F.K., SCHMIDT J. & TEN BERGE A.M.A. (1969) Dominance and recessiveness at the protein level in mutant x wild type crosses in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 104, 321-330.

° °
°